

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Fisiologia**  
**Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia**

Antônio Marcos Vargas da Silva

**DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA INSUFICIÊNCIA RENAL TERMINAL E NO**  
**DIABETES TIPO 2**

Porto Alegre, 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANTÔNIO MARCOS VARGAS DA SILVA

**DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA INSUFICIÊNCIA RENAL TERMINAL E NO  
DIABETES TIPO 2**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Co-orientadora: Dra. Beatriz D'Agord Schaan

Porto Alegre, abril de 2008.

*Dedico este trabalho a memória de meu  
querido avô Acácio.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço com admiração às orientadoras Prof. Maria Cláudia Irigoyen e Prof. Beatriz D'Agord Schaan, pelas oportunidades e ensinamentos.

Aos Prof. Marcello Bertoluci, Prof. Elvino Barros e Prof. Adriane Belló Klein, por todo o apoio e confiança.

Aos meus melhores amigos e colegas Rodrigo Plentz e Luis Signori, pelo companheirismo, ensinamentos e apoio incondicional. A Prof. Eneida Rabelo pelo grande apoio nas coletas de dados.

Aos pacientes, por entenderem nesse momento a importância da ciência.

Ao PPG Fisiologia/UFRGS e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelas oportunidades de pesquisa e por me acolher ao longo destes anos.

Família...

A minha mãe Maria Inês, pelo amor, carinho, incentivo e apoio por toda a vida. Ao meu pai Evaldo e ao meu avô Acácio, que de algum lugar, longe ou perto, estão sorrindo. A minha avó Maria Francisca, pela fé, amor e carinho. Graças a tudo o que vocês me ensinaram, o respeito, a honestidade e a perseverança, consegui chegar até aqui.

A minha namorada Laura, pelo amor, carinho, apoio e compreensão.

AMO VOCÊS.

A Deus, por guiar meus passos, iluminar meu caminho e me conceder paz por todos os dias de minha vida.

*Tenha sempre bons pensamentos  
porque os seus pensamentos se transformam em suas palavras.*

*Tenha boas palavras  
porque as suas palavras se transformam em suas ações.*

*Tenha boas ações  
porque as suas ações se transformam em seus hábitos.*

*Tenha bons hábitos  
porque os seus hábitos se transformam em seus valores.*

*Tenha bons valores  
porque os seu valores se transformam no seu próprio destino.*

*(MAHATMA GHANDI)*

## RESUMO

### DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA INSUFICIÊNCIA RENAL TERMINAL E NO DIABETES TIPO 2 <sup>1</sup>

Vários estudos envolvendo a avaliação da função endotelial em pacientes com insuficiência renal terminal (IRT) e em pacientes com diabetes tipo 2 (DM2) têm sido apresentados objetivando um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos e das condições que cercam essas patologias. As sessões de hemodiálise (HD) em pacientes com IRT e a microalbuminúria em pacientes com DM2 influenciam as respostas endoteliais e, diante disso, este trabalho constitui-se de dois estudos independentes com ambas as populações, sendo: o Estudo 1 objetivou avaliar a influência de uma sessão de HD na função endotelial venosa e no estresse oxidativo de nove pacientes com IRT comparados a um grupo controle (n=10). A função endotelial foi avaliada pela técnica de *Dorsal Hand Vein* e o estresse oxidativo pelas medidas de capacidade antioxidante total (TRAP) e de dano oxidativo à proteínas (Carbonilas). Antes da HD, os pacientes apresentaram reduzida venodilatação dependente do endotélio (VDE) na comparação com o controle ( $65,6 \pm 10,5\%$  vs.  $109,6 \pm 10,8\%$ ;  $P = 0,010$ ). Após a HD houve um aumento na VDE ( $106,6 \pm 15,7\%$ ;  $P = 0,045$ ). A venodilatação independente do endotélio foi similar em todas as comparações realizadas. A HD reduziu o TRAP ( $402,0 \pm 53,5$  vs  $157,1 \pm 28,3$  U of Trolox/ $\mu$ L plasma;  $P = 0,001$ ) e não alterou as carbonilas ( $P = 0,389$ ). O delta de VDE foi negativamente correlacionado com o delta de TRAP ( $r = -0,70$ ;  $P = 0,037$ ). Esses resultados sugerem que a sessão de HD melhora a função endotelial venosa associada a menor redução de antioxidantes. No Estudo 2 foram avaliados 28 pacientes com DM2, subdivididos em grupo normoalbuminúrico (n=16) e microalbuminúrico (n=12), com o objetivo de comparar entre os grupos a função endotelial no leito venoso e arterial. As funções endotelial venosa e arterial foram avaliadas pela técnica de *Dorsal Hand Vein* (venodilatação) e pela dilatação mediada pelo fluxo (FMD) da artéria braquial através de ultrasonografia de alta resolução, respectivamente. Pacientes microalbuminúricos apresentaram reduzida venodilatação ( $32,9 \pm 17,4\%$  vs.  $59,3 \pm 26,5\%$ , respectivamente;  $P = 0,004$ ) e FMD ( $1,8 \pm 0,9\%$  vs.  $5,1 \pm 2,4$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ), quando comparados a normoalbuminúricos. A venodilatação se correlacionou negativamente com albuminúria ( $r = -0,53$ ;  $P = 0,004$ ) e com HbA<sub>1c</sub> ( $r = -0,41$ ;  $P = 0,032$ ). O mesmo foi observado entre FMD e albuminúria ( $r = -0,49$ ;  $P = 0,007$ ) e HbA<sub>1c</sub> ( $r = -0,44$ ;  $P = 0,019$ ). Foi observada uma correlação positiva entre venodilatação e FMD ( $r = 0,50$ ;  $P = 0,007$ ). Assim, a função endotelial em ambos os leitos vasculares está prejudicada em pacientes com DM2 e microalbuminúria. Os dois métodos utilizados para avaliação da função endotelial se correlacionaram positivamente. Mesmo em um grupo de pacientes com bom controle metabólico, as respostas de vasodilatação se correlacionaram negativamente com HbA<sub>1c</sub>.

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (113 p.) Abril, 2008.

## ABSTRACT

### ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN END-STAGE RENAL DISEASE AND TYPE 2 DIABETES<sup>1</sup>

Several studies were shown, involving endothelial function assessment in patients with end-stage renal disease (ESRD) and in patients with type 2 diabetes (T2D), aiming a better understanding of physiopathological mechanisms and conditions surrounding these pathologies. Hemodialysis (HD) sessions in patients with ESRD and microalbuminuria in patients with T2D influence the endothelial responses and, therefore, this work was based on two independent studies, namely: Study 1 aimed at evaluating the influence of an HD session in venous endothelial function and oxidative stress of nine patients with ESRD compared to a control group (n=10). Endothelial function was assessed by dorsal hand vein technique and oxidative stress by total radical trapping antioxidant potential (TRAP) and protein oxidative damage (carbonyls). Before HD, the patients showed a reduced endothelium-dependent venodilation (EDV) compared with controls ( $65.6 \pm 10.5\%$  vs.  $109.6 \pm 10.8\%$ ;  $P = 0.010$ ). After HD there was an increase in EDV ( $106.6 \pm 15.7\%$ ;  $P = 0.045$ ). The endothelium-independent venodilation was similar in all comparisons performed. HD decreased TRAP ( $402.0 \pm 53.5$  vs  $157.1 \pm 28.3$  U of Trolox/ $\mu$ L plasma;  $P = 0.001$ ) and did not change the carbonyls ( $P = 0.389$ ). The delta in EDV was negatively correlated with the delta in TRAP ( $r = -0.70$ ;  $P = 0.037$ ). These results suggest that an HD session improves endothelial venous function, in association with an antioxidant effect. In Study 2 28 patients with T2D were evaluated, subdivided into normoalbuminuric (n=16) and microalbuminuric group (n=12), aiming to compare the endothelial function in venous and arterial bed between the groups. Venous and arterial endothelial function were assessed by the dorsal hand vein technique (venodilation) and brachial artery flow-mediated vasodilation (FMD) by high-resolution ultrasonography, respectively. Microalbuminuric patients presented impaired venodilation ( $32.9 \pm 17.4\%$  vs.  $59.3 \pm 26.5\%$ , respectively;  $P = 0.004$ ) and FMD ( $1.8 \pm 0.9\%$  vs.  $5.1 \pm 2.4$ , respectively;  $P < 0.001$ ), as compared to normoalbuminuric patients. Venodilation was negatively correlated with microalbuminuria ( $r = -0.53$ ;  $P = 0.004$ ) and HbA<sub>1c</sub> ( $r = -0.41$ ;  $P = 0.032$ ). The same was observed between FMD and albuminuria ( $r = -0.49$ ;  $P = 0.007$ ) and HbA<sub>1c</sub> ( $r = -0.44$ ;  $P = 0.019$ ). Venodilation was positively correlated with FMD ( $r = 0.50$ ;  $P = 0.007$ ). Thus, both venous and arterial endothelial function are impaired in patients with T2D and microalbuminuria. The two methods used for endothelial function evaluation were positively correlated. Even though patients had good metabolic control as a group, vasodilation responses were negatively correlated with HbA<sub>1c</sub>.

<sup>1</sup> Doctoral Thesis in Biological Sciences: Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (113 p.) April, 2008.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	Sistema de avaliação pela técnica de <i>Dorsal Hand Vein</i> .....	40
2	Transdutor para avaliação da função endotelial venosa.....	40
3	Avaliação da função endotelial arterial por ultrasonografia.....	41

## LISTA DE FIGURAS

### Estudo 1

- 1 Data on the evaluation of endothelium venous function showing the average maximal percentage venodilation vs acetylcholine doses..... 62
- 2 Scattergram plotting  $\Delta$  of TRAP (delta of plasma total antioxidant capacity) reduction and  $\Delta$  of venodilation induced by acetylcholine during the endothelium venous function evaluations..... 63

### Estudo 2

- 1 Correlations between the percentage (%) of venodilation by acetylcholine and urinary albumin excretion (UAE; Panel A), % of venodilation by acetylcholine and HbA<sub>1c</sub> (Panel B), and % of venodilation by acetylcholine and flow-mediated vasodilation (Panel C)..... 80

## LISTA DE TABELAS

### Estudo 1

- 1 Clinical and laboratory characteristics of controls and ESRD patients before (pre-HD) and after hemodialysis (post-HD)..... 60
- 2 Endothelial venous function of controls and ESRD patients before (pre-HD) and after hemodialysis (post-HD)..... 61

### Estudo 2

- 1 Baseline clinical and laboratory characteristics of the patients..... 78
- 2 Venous and arterial endothelial function of the patients, according to their urinary albumin excretion levels..... 79

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterina
DDE	Vasodilatação dependente do endotélio
DIE	Vasodilatação independente do endotélio
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
EUA	Excreção urinária de albumina
FMD	Vasodilatação mediada pelo fluxo
HbA <sub>1c</sub>	Hemoglobina glicada
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HD	Hemodiálise
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular
IRC	Insuficiência renal crônica
IRT	Insuficiência renal terminal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	Colesterol LDL
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida)
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
PAI-1	Inibidor 1 de ativador de plasminogênio
PKC	Proteína quinase C
PCR	Proteína C-reativa
TCA	Ácido tricloroacético
TFG	Taxa de filtração glomerular
tHcy	Homocisteína
TRAP	Capacidade antioxidante total

VCAM-1	Molécula 1 de adesão de célula vascular
vWf	Von Willebrand factor

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Endotélio e função endotelial.....	15
1.2	Particularidades do endotélio venoso e arterial .....	17
1.3	Disfunção endotelial.....	20
1.4	Métodos de avaliação da função endotelial.....	23
1.5	Insuficiência renal terminal e a hemodiálise.....	25
1.6	Disfunção endotelial de pacientes em hemodiálise.....	27
1.7	Disfunção endotelial no diabetes tipo 2.....	31
1.8	Microalbuminúria e disfunção endotelial no diabetes tipo 2.....	34
2	OBJETIVOS.....	37
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2	Objetivos específicos.....	37
3	ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	38
3.1	Avaliação da função endotelial venosa.....	38
3.2	Avaliação da função endotelial arterial.....	40
3.3	Avaliação do estresse oxidativo.....	41
3.4	Medidas laboratoriais.....	43
4	RESULTADOS.....	44
4.1	Estudo 1: Hemodialysis improves endothelial venous function in end-stage renal disease.....	45
4.2	Estudo 2: Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes.....	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	81
6	REFERÊNCIAS.....	87

7	ANEXO A - Declaração de recomendação favorável para publicação do Estudo 1 no <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i> .....	104
	ANEXO B - Comprovante de submissão do Estudo 2 ao <i>Diabetes Care</i> .....	105
	ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido - Estudo 1.....	106
	ANEXO D - Termo de consentimento livre e esclarecido - Estudo 2.....	108
	ANEXO E - Doses de fenilefrina utilizadas no protocolo de avaliação da função endotelial venosa.....	110
	ANEXO F - Doses de acetilcolina utilizadas no protocolo de avaliação da função endotelial venosa.....	111
	ANEXO G - Concentração de fenilefrina diluída nas concentrações de acetilcolina e nitroprussiato de sódio para manter o estado de vasoconstrição (ED70).....	112
	ANEXO H - Doses de nitroprussiato de sódio utilizadas no protocolo de avaliação da função endotelial venosa.....	113

## 1 INTRODUÇÃO

O endotélio é uma monocamada de células que reveste internamente todo o leito vascular do organismo humano interpondo-se entre o sangue e a camada muscular lisa dos vasos. Algumas características peculiares do endotélio, como a de ser considerado a maior glândula do corpo, já indicam que as suas funções vão além de uma simples barreira física, mas também atua como uma barreira metabólica e um elemento de grande pluralidade funcional. A célula endotelial atua na degradação de substâncias impedindo a penetração dessas em camadas mais profundas do vaso, na modulação do tônus vascular, na coagulação, no controle da trombólise e do remodelamento vascular, bem como nas respostas inflamatórias e imunológicas (DA LUZ et al., 2003).

O fenótipo das células endoteliais pode ser alterado por vários fatores, sem necessariamente provocar a lesão endotelial, desencadeando uma série de eventos, que ao longo do tempo, podem culminar com as alterações estruturais na parede arterial levando à formação da placa aterosclerótica (HODIS, 1999; BURDGE; CALDER, 2005). A disfunção endotelial se caracteriza pelo desequilíbrio na produção e/ou na sensibilidade dos fatores derivados do endotélio, prevalecendo na aterosclerose a ação dos fatores constritores pró-aterogênicos em detrimento dos fatores de relaxamento derivados do endotélio anti-trombóticos e anti-miogênicos (BONETTI et al., 2003).

Embora por muito tempo o endotélio tenha sido considerado uma estrutura inerte, estudos que investigam a função endotelial em diversas populações, bem como os mecanismos fisiopatológicos de disfunção e o endotélio como alvo terapêutico, vêm se multiplicando, motivados pela observação de que a disfunção endotelial pode ser considerada como uma síndrome que exhibe manifestações sistêmicas e está fortemente associada a eventos cardiovasculares (SCHACHINGER et al., 2000; LERMAN; ZEIHNER, 2005) e à progressão da aterosclerose (SCHACHINGER et al., 2000).

A disfunção endotelial tem sido proposta como um evento precoce de grande importância fisiopatológica no processo aterosclerótico (CELERMAJER et al., 1992; SUWAIDI et al., 2000) e representa uma importante ligação entre doenças como hipertensão, insuficiência renal crônica (IRC) ou diabetes e o risco elevado de eventos cardiovasculares evidenciado em pacientes com essas condições.

Pacientes com IRC apresentam disfunção endotelial e elevados níveis de estresse oxidativo que progridem com a evolução e a gravidade da doença renal até o estágio de insuficiência renal terminal (IRT) ou dialítica. Entre os pacientes com IRT a forma de

tratamento mais comum é a hemodiálise (HD), estando esses propensos a duas condições que afetam a função endotelial: a IRT e suas conseqüências repercutindo em todos os processos de hemostasia, e a hemodiálise, que atua como terapia renal substitutiva no *clearance* do organismo, porém ocasiona extensas alterações hidroeletrólíticas e hemodinâmicas agudas e crônicas.

A avaliação da função endotelial frente a uma sessão de HD vem sendo relatada em alguns estudos com resultados conflitantes. O estresse oxidativo pode exercer um papel fundamental nas alterações da função endotelial decorrentes da HD e, portanto faz-se necessário um maior entendimento da associação entre essas variáveis.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) prejudica substancialmente as propriedades das células endoteliais e, conseqüentemente, a função endotelial. O DM2 na presença de microalbuminúria, referida como um forte preditor de nefropatia diabética e morte por doença cardiovascular (MOGENSEN, 1984), induz à exacerbação da disfunção endotelial e maiores índices de mortalidade. Além disso, a nefropatia diabética apresenta-se como a principal causa de IRT em pacientes com DM2 (GROSS et al., 2005) e, portanto, merece atenção desde a fase de nefropatia incipiente ou fase de microalbuminúria.

Vários investigadores vêm abordando a relação da disfunção endotelial associada à microalbuminúria no DM2 considerando apenas as respostas de vasodilatação no leito arterial, sem monitorar as respostas endoteliais no sistema venoso. No entanto, o leito vascular venoso não está exposto aos efeitos da aterosclerose e da hipertensão, comumente observadas em pacientes com DM2, e isso sugere a avaliação da função endotelial nesse território como uma estratégia para minimizar algumas variáveis intervenientes.

### **1.1 Endotélio e função endotelial**

O endotélio funciona como um sensor biológico que responde a forças hemodinâmicas e a partículas presentes no sangue através da liberação de diversas substâncias biologicamente ativas essenciais para a manutenção da integridade vascular. As células endoteliais formam a superfície mais exposta da camada íntima vascular, apresentando permeabilidade seletiva, de caráter não trombogênico, com atividade metabólica exuberante, tendo também a capacidade de produzir diversas substâncias vasoativas. Através da liberação de substâncias vasodilatadoras, como o fator de relaxamento derivado do endotélio, hoje identificado como óxido nítrico (NO), e de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina, o endotélio é o principal responsável pela regulação do tônus vascular e pela migração e proliferação de

diferentes tipos celulares no espaço subendotelial. Além disso, as células endoteliais são fontes de substâncias que afetam o crescimento celular, a função plaquetária e de monócitos, e a coagulação do sangue (MOMBOULI; VANHOUTTE, 1999).

A interação entre as células endoteliais, as plaquetas, os polimorfonucleares, os monócitos circulantes e as células musculares lisas da parede vascular culmina na produção e expressão de diversas substâncias biologicamente ativas, incluindo citocinas, prostaglandinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, óxido nítrico e endotelina. Algumas ações ocorrem na célula de origem (regulação autócrina), enquanto outras incidem em células adjacentes (regulação parácrina). Algumas substâncias, em especial o óxido nítrico, também podem ser secretadas na circulação e agir a distância como verdadeiros hormônios/fatores (regulação endócrina) (LAURINDO; PILEGGI, 1994).

Os fatores biológicos derivados do endotélio podem ser divididos em fatores de relaxamento e fatores constritores derivados do endotélio. Os fatores de relaxamento derivados do endotélio são representados pelo NO, prostaciclina, pelo peptídeo natriurético do tipo C e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio e suas respectivas vias de transdução de sinal, as quais promovem a proteção do endotélio através da vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e da proliferação das células musculares lisas vasculares (LAURINDO; PILEGGI, 1994; WAJCHENBERG, 2002).

Desde os estudos pioneiros de Furchgott e Zawadzki (1980), tem sido demonstrado o papel fundamental do NO na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, especialmente a aterosclerose. O NO é o principal fator responsável pelo relaxamento da vasculatura; dependendo da sua concentração, ele pode ativar ou inibir a formação dos demais fatores que atuam no endotélio e conseqüentemente nas células musculares lisas vasculares (WADE; FITZPATRICK, 1997). Suas funções anti-ateroscleróticas incluem inibição da adesão e migração dos leucócitos, impedimento da agregação plaquetária, redução da permeabilidade endotelial às macromoléculas lipoprotéicas, impedimento do acúmulo sub-endotelial de colesterol LDL (LDL-c) e a sua oxidação, prevenção da formação das células espumosas (*foam cells*), impedimento da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares, e ainda contribuição na vasodilatação dos vasos coronarianos durante o aumento de demandas metabólicas (HONING et al., 1999).

Em oposição funcional aos fatores de relaxamento, existem os fatores constritores derivados do endotélio, que são representados pela angiotensina II, endotelina-1 (ET-1), serotonina, tromboxano A<sub>2</sub>, espécies reativas de oxigênio (ERO) e as demais isoformas da

prostaglandina H<sub>2</sub>, que possuem um papel fundamental nas respostas inflamatórias agudas e crônicas, devido às ações pró-ateroscleróticas e pró-trombóticas (WAJCHENBERG, 2002).

Os fatores de relaxamento e constritores derivados do endotélio se encontram em equilíbrio para manter a homeostase, entretanto, a preponderância de um grupo de fatores em relação ao outro caracteriza a disfunção endotelial. Exemplos de patologias onde prevalecem os fatores de relaxamento são o choque anafilático e a septicemia. Patologias onde há a preponderância dos fatores constritores são a aterosclerose, a hipertensão, a doença arterial coronariana e o diabetes (WAJCHENBERG, 2002). Observa-se pelos exemplos citados, que o predomínio dos fatores constritores é normalmente relacionado a patologias de evolução crônica e que apresentam a maior prevalência. Estas patologias apresentam pontos comuns que são a dislipidemia, a inflamação, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial.

As células endoteliais também secretam moduladores inflamatórios como o NO, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adesão de célula vascular (VCAM-1), selectina-E e fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). A modulação da homeostase pelo endotélio envolve a liberação do ativador do plasminogênio, inibidor do fator tecidual, von Willebrand factor (vWf), NO, prostaciclina, tromboxano A<sub>2</sub>, inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1) e fibrinogênio (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004).

Um novo e fascinante aspecto da função endotelial vem surgindo de pesquisas com células endoteliais progenitoras. Após o primeiro relato de Asahara et al. (1997), tem ocorrido um substancial interesse no entendimento da mobilização e função das células endoteliais progenitoras. Essas são células primitivas da medula óssea com habilidade de maturar-se em células endoteliais e exercer papel fisiológico no reparo de lesões do endotélio (SZMITKO et al., 2003a). As células endoteliais progenitoras circulantes podem representar um importante mecanismo de reparo endógeno para manutenção da integridade da camada endotelial e no processo de neovascularização em órgãos isquêmicos.

## **1.2 Particularidades do endotélio venoso e arterial**

Alguns estudos clássicos, abordando a distribuição de receptores e as diferentes respostas a agentes farmacológicos, são fundamentais para o entendimento e comparação do comportamento fisiológico entre o leito vascular venoso e arterial. Com relação à distribuição e resposta venosa à administração de agentes adrenérgicos, um conjunto de observações comparando a ação da noradrenalina (agonista  $\alpha$  não seletivo), da fenilefrina (agonista  $\alpha$ -1) e

do azepexole (agonista  $\alpha$ -2), demonstrou que todos esses agentes induziram resposta vasoconstritora, sugerindo que as veias expressam todos os tipos de receptores  $\alpha$ . Como a resposta à fenilefrina foi a mais marcada, sugere-se que a ação dos receptores  $\alpha$ -1 seja predominante nas veias (SCHULTE et al., 1985).

Enquanto a resposta mediada por receptores  $\alpha$  adrenérgicos parece ser similar em artérias e veias, o receptor  $\beta$  induz vasodilatação em artérias e vasoconstrição no sistema venoso. Essa observação foi testada de maneira mais completa em veias superficiais da mão utilizando bloqueio farmacológico com  $\beta$ -antagonistas e infusão de noradrenalina e adrenalina. Demonstrou-se que o bloqueio desencadeou uma vasoconstrição marcada pela adrenalina, evidenciando a presença de receptores  $\beta$  nas veias cuja ação vasodilatadora foi suprimida (SICUTERI et al., 1966). Portanto, esses experimentos atestam a presença de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas veias, desempenhando função vasodilatadora semelhante àquela já descrita no sistema arterial.

Além da família de receptores adrenérgicos descritos nas veias, experimentos conduzidos com infusão de serotonina em veias superficiais demonstram uma marcada vasoconstrição, por sua vez bloqueada com a utilização do agente antagonista do receptor de serotonina. Esses achados indicam a presença de receptores serotoninérgicos ao nível das veias e a ação destes receptores em tudo parece similar àquela produzida no sistema arterial (DEL BIANCO; SICUTERI, 1975).

Estudos *in vitro* que compararam a artéria mamária interna com a veia safena de humanos confirmaram o efeito de relaxamento também dependente do endotélio à acetilcolina, trombina e difosfato de adenosina em ambos os tipos de vasos, embora com resposta mais marcante nas artérias do que nas veias (LUSCHER et al., 1988). Mais especificamente, Yang et al. (1991), demonstraram que o relaxamento diretamente através do óxido nítrico foi similar entre a veia safena e artéria mamária interna, no entanto, a liberação de óxido nítrico pela acetilcolina foi menor no leito venoso do que no arterial.

Em um modelo experimental *in vitro* utilizando veias da mão de humanos, foi demonstrado que a acetilcolina produziu somente um pequeno relaxamento, o qual não foi afetado pela remoção do endotélio (ARNER; HOGESTATT, 1991). Porém em humanos, estudos *in vivo* de Collier e Vallance (1990), avaliando a veia superficial da mão, demonstraram que a remoção do endotélio através da infusão de água destilada produziu vasoconstrição e perda da ação dilatadora da acetilcolina, enquanto a ação vasodilatadora induzida pela nitroglicerina (independente do endotélio) não foi comprometida. Esse estudo

utilizando a veia da mão trouxe a primeira evidência de ação vasodilatadora dependente do endotélio na musculatura lisa vascular em veias humanas *in vivo*.

Experimentos adicionais utilizando NG-monometil L-arginina, substância que inibe a síntese de NO a partir da L-arginina, infundida em veias superficiais da mão, também confirmam este tipo de resposta dependente do endotélio e já descrita em artérias, pois identificou-se inibição da vasodilatação induzida por acetilcolina e por bradicinina, sem influência na resposta à nitroglicerina (VALLANCE et al., 1989).

Entretanto outros pesquisadores salientam algumas distinções mais pronunciadas entre o leito vascular venoso e arterial. Os efeitos vasoconstritores da endotelina-1 também foram descritos em veias de forma similar aos efeitos em artérias. No entanto, a capacidade das veias de gerar NO para contrabalancear os efeitos constritores da endotelina-1 parecem ser de menor magnitude quando comparados à capacidade do sistema arterial (LUSCHER et al., 1990).

O endotélio venoso libera NO quando estimulado por agonistas como acetilcolina e bradicinina, porém, isso não ocorre continuamente como nas artérias (VALLANCE, 2000) e, além disso, o relaxamento venoso provocado pela acetilcolina é de aproximadamente 30% menor que o das artérias (THOM et al., 1987; LUSCHER et al., 1988). Seidel e La Rochelle (1987), em estudo com artérias femorais e veias safenas de cães, sugeriram que a diferença na resposta de vasodilatação dependente do endotélio entre artérias e veias era consequência da menor liberação de NO pelo endotélio venoso ao invés de uma menor resposta da musculatura lisa venosa. Essa discrepância foi atribuída à diferença de expressão gênica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) dependendo do órgão e do leito arterial ou venoso, sendo que a quantidade de eNOS é maior no endotélio arterial do que no venoso (BACHMANN et al., 1995; ANDRIES et al., 1998).

As diferenças entre o endotélio de diferentes leitos vasculares têm grande relevância clínica, visto que veias como a safena são utilizadas para a revascularização em pacientes com obstrução coronariana. Além disso, os eventos tromboembólicos em território venoso caracterizam-se como um evento agudo e são influenciados por fatores de risco diferentes daqueles da trombose arterial que ocorrem em vasos com doença aterosclerótica prévia (HE, 2005; KANELLAKI-KYPARISSI et al., 2005).

O conjunto dessas observações acerca do comportamento fisiológico do endotélio venoso indica que o padrão de resposta aos diferentes agentes vasodilatadores e vasoconstritores nas veias é genericamente comparável às respostas no sistema arterial, talvez havendo uma tendência a respostas vasodilatadoras de menor magnitude no território venoso.

Além disso, sustenta-se o fato de que o sistema venoso possui um complexo de receptores vasoativos que respondem de maneira similar aos efeitos já amplamente descritos em nível arterial. De certa forma, esse perfil autoriza a execução de diferentes experimentos utilizando veias superficiais, partindo de princípios inicialmente descritos em artérias.

### **1.3 Disfunção endotelial**

Desde 1980, quando se descobriu que a acetilcolina necessitava da presença de células endoteliais para promover vasodilatação (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), e posteriormente, com a detecção pela primeira vez da disfunção endotelial na vasculatura do antebraço em humanos hipertensos em 1990 (PANZA et al., 1990), a camada de células endoteliais vem despertando interesse cada vez maior da comunidade científica.

A disfunção endotelial é caracterizada pela perda das propriedades do endotélio, isto é, alteração na síntese de proteínas, aumento do tônus e da permeabilidade vascular, aquisição de atividade pró-trombótica e anti-fibrinolítica devido à diminuição da produção e disponibilidade do NO e por preponderância de fatores vasoconstritores liberados pelo endotélio, em detrimento aos vasodilatadores (POMILIO et al., 2002). A disfunção endotelial promove, portanto, alteração no perfil anti-aterogênico com migração e proliferação de células musculares lisas, agregação plaquetária, oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), adesão de monócitos e plaquetas e a síntese de citocinas inflamatórias, contribuindo para a aterogênese (VITA; KEANEY, 2002).

A disfunção endotelial ocorre em condições consideradas de maior risco para doença arterial coronariana, como obesidade (HASHIMOTO et al., 1998), tabagismo (MORENO et al., 1998), diabetes mellitus (ANDERSON et al., 2001; RUDERMAN et al., 2003), hipertensão arterial sistêmica (PANZA et al., 1990), dislipidemia (GIANNATTASIO et al., 2005) e sedentarismo (GREEN et al., 2003). Além da associação com os fatores de risco coronariano, a disfunção endotelial está diretamente relacionada com a extensão e a severidade da doença arterial coronariana (NEUNTEUFL et al., 1997). No entanto, a disfunção endotelial está relacionada a eventos cardiovasculares mesmo em pacientes com artérias coronárias angiograficamente normais (WIDLANSKY et al., 2003).

A fisiopatologia da disfunção endotelial é complexa e envolve múltiplos mecanismos. No entanto, alguns estão presentes na maioria das condições mencionadas acima e merecem ser explanados nesta revisão.

A redução de NO tem sido freqüentemente relacionada à presença de disfunção endotelial. A atividade reduzida da eNOS na presença de inibidores endógenos ou exógenos ou pela redução da disponibilidade de seu substrato, a L-arginina, pode ocasionar a redução da biodisponibilidade de NO. As ERO podem neutralizar o NO pela geração de peroxinitrito (KOPPENOL et al., 1992), que se apresenta como um mediador da oxidação de LDL e exerce importante papel aterogênico (GRIENGLING; FITZGERALD, 2003), além de promover a degradação de tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>; cofator da eNOS) (MILSTIEN; KATUSIC, 1999), resultando no desacoplamento da eNOS. As ERO também induzem a redução de BH<sub>4</sub> para 7,8-dihydrobiopterina, a qual leva à formação reduzida de dímeros ativos da eNOS, à menor atividade oxigenase e produção de NO. Diante disso, a função redutase da eNOS é ativada para produzir mais ERO, resultando em elevação do estresse oxidativo e conseqüentes efeitos deletérios na função endotelial e vascular (LANDMESSER et al., 2003).

O estresse oxidativo, definido como o dano tecidual resultante do desequilíbrio entre a produção excessiva de componentes oxidantes e insuficiente de mecanismos de defesa antioxidante (SIES, 1997), também está relacionado ao estado pró-inflamatório da parede vascular, com as ERO promovendo *upregulation* das moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) e quimiotáticas (proteína 1 quimioatraente para monócitos) (GRIENGLING; FITZGERALD, 2003). A VCAM-1 induz ligação de monócitos e linfócitos T, o primeiro passo de invasão da parede vascular pelas células inflamatórias (LIBBY, 2002). Com isso, a inflamação exerce um efeito direto na redução da biodisponibilidade do NO, além do papel da proteína C-reativa (PCR) em reduzir a atividade da eNOS (VENUGOPAL et al., 2002; VERMA et al., 2002).

As ERO também estão envolvidas na mediação da disfunção endotelial, levando à morte celular programada (apoptose) e a uma forma de apoptose caracterizada pelo desprendimento das células endoteliais chamado de *anoikis* (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003). A angiotensina II tem sido envolvida na fisiopatologia da disfunção endotelial pela indução da inflamação vascular (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2003), mas também por promover o aumento das ERO pela estimulação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase (TOUYZ; SCHIFFRIN, 1999; TOUYZ et al., 2002), sendo essa a principal fonte de estresse oxidativo (HAMILTON et al., 2002; TOUYZ et al., 2002).

Além desses mecanismos, estudos em animais (VIRDIS et al., 2003) e em humanos (VIRDIS et al., 2001) sugerem que a hiperhomocisteinemia reduz a biodisponibilidade de NO via estresse oxidativo. Evidências demonstram que a homocisteína pode causar acúmulo de dimetilarginina assimétrica (ADMA) pela inibição da enzima dimetilaminohidrolase

dimetilarginina. Estudos em humanos têm confirmado que a hiperhomocisteinemia pode induzir à disfunção endotelial via o acúmulo de ADMA (BOGER et al., 2001; STUHLINGER et al., 2003). Vallance et al. (1992) identificaram a ADMA como um inibidor endógeno competitivo da eNOS, estando relacionada à disfunção endotelial (ENDEMANN; SCHIFFRIN, 2004) e promovendo a redução de fluxo sanguíneo renal efetivo e o aumento da resistência renovascular e da pressão arterial (KIELSTEIN et al., 2003).

Baseado no relato de que o endotélio vascular pode servir como um “barômetro” para os insultos cumulativos no sistema cardiovascular (VITA; KEANEY, 2002), vários estudos têm avaliado a relação da função endotelial com fatores de risco cardiovasculares e um crescente número de estudos têm investigado o valor prognóstico da função endotelial em prever eventos cardiovasculares.

A medida de função endotelial foi avaliada em 2883 participantes do *Framingham Heart Study* e os resultados mostraram que a vasodilatação mediada pelo fluxo (FMD) na artéria braquial se correlacionou negativamente com a idade, pressão arterial sistólica, índice de massa corporal, hipolipemiantes e tabagismo, enquanto foi positivamente relacionada com sexo feminino, frequência cardíaca e capacidade funcional avaliada pelo teste de caminhada de 6 minutos. Também foi observada uma redução de 0,62 % no percentual de FMD a cada 20 mmHg de aumento da pressão sistólica e de 0,58% a cada década de vida (BENJAMIN et al., 2004).

Shimbo et al. (2007), em um estudo de coorte prospectivo com 842 pacientes, encontraram uma associação entre FMD e eventos cardiovasculares, observando que níveis mais baixos de FMD predizem infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte por doença vascular em indivíduos assintomáticos, porém, o valor preditivo da FMD não se mostrou independente de fatores de risco cardiovasculares tradicionais, o que pode ter sido limitado pela amostra relativamente pequena.

Witte et al. (2005) realizaram uma análise de meta-regressão com 211 artigos e relataram que a função endotelial, avaliada pela FMD, está relacionada a fatores de risco cardiovasculares tradicionais e ao risco estimado de doença arterial coronariana em 10 anos somente em populações de baixo risco pelo escore de Framingham.

Em uma população oriunda da comunidade (*The Framingham Offspring Study*), 2.924 indivíduos sem diabetes foram acompanhados por 7 anos com medidas de marcadores hemostáticos de disfunção endotelial, como PAI-1 e vWf. O aumento dos níveis destes marcadores esteve associado ao risco elevado de DM2, independentemente de outros fatores de risco como obesidade, resistência à insulina e inflamação (MEIGS et al., 2006).

Em um estudo de coorte baseado em uma população de 2.791 idosos, a FMD na artéria braquial foi um significativo preditor de eventos cardiovasculares, sendo que a taxa de sobrevivência livre de eventos cardiovasculares em um período de 5 anos foi significativamente maior nos indivíduos com melhores níveis de função endotelial. No entanto, a adição da medida de função endotelial a um melhor modelo de Cox acrescentou muito pouco (< 1%) ao valor prognóstico em relação a escores/fatores de risco cardiovasculares tradicionais (YEBOAH et al., 2007).

De fato, nos últimos anos as investigações da função endotelial como valor preditivo de eventos cardiovasculares vêm aumentando tanto em amostras pequenas e altamente selecionadas quanto em grandes amostras baseadas em comunidades, mas os achados ainda são controversos, com alguns estudos demonstrando a associação entre FMD e eventos cardiovasculares (CHAN et al., 2003; GOKCE et al., 2003; MEYER et al., 2005), enquanto outros autores não relatam essa associação (FRICK et al., 2005).

Mesmo diante de achados conflitantes, um número maior de observações refere a FMD como um forte preditor de eventos cardiovasculares em populações com níveis de risco variado. No entanto, a medida de FMD como valor preditivo independente de outros fatores de risco tradicionais ainda carece de maior elucidação, sendo que até o momento essa medida vem se mostrando com melhor valor preditivo em populações de baixo ou moderado risco (MANCINI, 2004).

#### **1.4 Métodos de avaliação da função endotelial**

A função endotelial tem sido amplamente avaliada baseando-se no princípio de que a vasomotricidade dependente do endotélio reflete as funções importantes desse órgão e, portanto, uma vasodilatação dependente do endotélio (DDE) reduzida representaria a disfunção endotelial (LANDMESSER; DREXLER, 2005).

A função endotelial pode ser investigada de forma invasiva ou não-invasiva, com várias técnicas, em diferentes leitos vasculares e por diversos estímulos farmacológicos ou mecânicos. As artérias coronárias podem ser avaliadas com a utilização de angiografia biplanar quantitativa para mensuração das mudanças do diâmetro vascular em resposta à infusão de acetilcolina, bradicinina ou pela indução de estresse de cisalhamento (*shear-stress*) (KATO et al., 1997) ou diante de teste pressórico ao frio através da imersão das mãos do paciente em gelo durante 120 s (COSSON et al., 2006). Outro método de avaliação é a pletismografia de oclusão venosa para mensuração do fluxo sanguíneo do antebraço em

resposta à infusão de acetilcolina na artéria braquial (BENJAMIN et al., 1995). A natureza invasiva dessas técnicas, no entanto, por envolver a canulação de uma artéria e a infusão de drogas vasoativas (KHAN et al., 2000), torna inviável a sua ampla utilização na prática clínica. Assim, as técnicas que envolvem procedimentos não-invasivos ou com infusões de drogas em baixas concentrações e com efeitos somente em pequenos segmentos vêm sendo cada vez mais utilizadas.

A avaliação da função endotelial de forma não-invasiva pode ser feita através da captação de imagens da artéria braquial por ultrasonografia de alta resolução (CORRETTI et al., 2002). A FMD mede a DDE em resposta à hiperemia reativa e ao estresse de cisalhamento, sendo um método amplamente utilizado e referido recentemente como a técnica não-invasiva de escolha para medida de função endotelial, com boa reprodutibilidade (DONALD et al., 2006). A hiperemia reativa ocorre após um período de isquemia induzido por oclusão da artéria braquial devido à insuflação de um manguito aneróide posicionado no braço ou antebraço, ocorrendo liberação progressiva de mediadores vasodilatadores como a adenosina e íons  $H^+$  pelo tecido isquêmico. Ao ocorrer a liberação do fluxo arterial, surge a hiperemia reativa, com o fluxo sanguíneo aumentando de 100 a 300% em relação ao basal, promovendo estresse de cisalhamento e permitindo a entrada de cálcio intracelular que ativa a eNOS, liberando NO (JOANNIDES et al., 1995). O valor exato de vasodilatação que representa uma resposta normal de DDE e de vasodilatação independente do endotélio (DIE) não está bem estabelecido, principalmente devido às diferenças de idade, sexo e métodos de avaliação (KUVIN et al., 2001). Entretanto, um valor de ponto de corte de 8% (GAENZER et al., 2001; GOKCE et al., 2003) tem sido proposto para representar uma resposta de DDE normal. Em pacientes com doença vascular periférica, uma DDE  $< 8,1\%$  foi associada com um aumento de nove vezes na taxa de morbidade e mortalidade comparado com indivíduos com DDE  $\geq 8,1\%$  (GOKCE et al., 2003). A descrição mais extensa dessa técnica será detalhada ao longo do texto na seção Metodologia.

Outra técnica não-invasiva que vem sendo utilizada é a tonometria de artéria periférica pela hiperemia reativa (MAHMUD et al., 2006; HALLER et al., 2007), a qual avalia a função endotelial pela combinação da dilatação mediada por fluxo e pelas medidas da amplitude de onda de pulso arterial através de um sensor pneumático posicionado no dedo indicador. A reatividade microvascular da pele do antebraço ou do dorso do pé (KHAN et al., 2000) é avaliada por fluxometria com laser Doppler, tendo como estímulo vasodilatador dependente do endotélio a iontoforese de acetilcolina.

A técnica de complacência da veia dorsal da mão é um método minimamente invasivo descrito por Aellig (1981) e que vem sendo utilizado em nosso laboratório (RUBIRA et al., 2007; SIGNORI et al., 2008). Consiste na infusão de drogas vasoativas em uma veia superficial do dorso da mão, somente com efeitos locais, para mensurar a DDE em resposta à acetilcolina, bradicinina ou isoprenalina. Outra técnica que vem sendo cada vez mais utilizada é a medida da espessura da camada íntima-média da carótida comum por ultrassonografia, a qual representa um marcador estrutural de aterosclerose e correlaciona-se inversamente com a FMD na artéria braquial (JUONALA et al., 2004). A pletismografia de oclusão venosa pode ser utilizada para medir as alterações no fluxo sanguíneo do antebraço em resposta à hiperemia reativa (HIGASHI et al., 2001) e, dessa forma, caracteriza-se também como um método não-invasivo para avaliação da função endotelial.

Entre os marcadores plasmáticos de disfunção endotelial mencionam-se o ativador de plasminogênio tecidual (STEHOUWER et al., 2002), o vWf (MANNUCCI, 1998), a selectina-E e moléculas de adesão (FRIES et al., 1993). Além desses, novos marcadores de ativação da célula endotelial têm sido propostos, como o receptor de LDL oxidado do tipo lectina, CD40 ligante, PCR, ADMA (SZMITKO et al., 2003b) e ET-1 (SCHIFFRIN et al., 1997).

### **1.5 Insuficiência renal terminal e a hemodiálise**

A doença renal crônica é definida como a presença de lesão renal, associada ou não à diminuição da filtração glomerular por um período igual ou superior a três meses (LEVEY et al., 2003). A doença renal crônica é classificada em cinco estágios conforme a presença de lesão renal e nível de função renal estimado pela taxa de filtração glomerular (TFG), independente do diagnóstico. Os estágios estão definidos pelos seguintes parâmetros: Estágio I –  $TFG \geq 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , representando lesão renal com função renal normal; Estágio II –  $TFG$  entre 60 e  $89 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , equivalendo à insuficiência renal leve ou funcional (uréia e creatinina plasmática normais, sem sinais ou sintomas clínicos importantes); Estágio III –  $TFG$  entre 30 e  $59 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , correspondendo à insuficiência renal moderada ou laboratorial (discretos sinais e sintomas de uremia); Estágio IV –  $TFG$  entre 15 e  $29 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , indicando insuficiência renal grave ou clínica (síndrome urêmica); e Estágio V –  $TFG < 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , equivalente à falência renal, definida como IRT ou dialítica (LEVEY et al., 2003).

Na ocorrência de IRT os rins tornam-se incapazes de manter a homeostase do meio interno, sendo necessário o uso de terapia renal substitutiva através de hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal. Como a incidência de IRT vem aumentando mundialmente, acompanhada de redução na mortalidade em diálise, a prevalência de pacientes em terapia renal substitutiva é progressivamente maior. No Brasil, conforme o último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, em 2007 o número estimado de pacientes em diálise foi de 73.605, sendo 66.833 (90,8%) em programa de HD distribuídos em 546 centros de diálise. Esse número vem crescendo com uma variação anual estimada de 8,1% entre 2004 e 2007.

A HD é definida como um processo de transferência de massa baseado na difusão entre o sangue e o líquido de diálise, modulado por uma membrana semipermeável (BARROS et al., 1999).

Desde a década de 70 é reconhecido que pacientes com IRT em tratamento dialítico apresentam mortalidade cardiovascular mais precoce do que indivíduos da população em geral (LINDNER et al., 1974), sendo a doença cardiovascular a principal causa de morte desses pacientes (LOCATELLI et al., 2000).

No entanto, fatores de risco cardiovasculares tradicionais em pacientes com IRT como diabetes, hipertensão, dislipidemia e idade avançada não explicam completamente a elevada prevalência de doenças cardiovasculares nesses pacientes (BAIGENT et al., 2000), sugerindo que fatores de risco emergentes como disfunção endotelial e estresse oxidativo possam apresentar um importante papel na patogênese da doença cardiovascular urêmica.

As complicações cardiovasculares em pacientes com IRC estão associadas com concomitante remodelamento cardíaco e vascular, incluindo hipertrofia ventricular esquerda e hipertrofia das paredes arteriais. O endotélio vascular influencia no processo de remodelamento arterial e em pacientes renais crônicos a disfunção endotelial pode ser um fator importante nas alterações cardiovasculares (PANNIER et al., 2000).

Evidências apontam para DDE reduzida em pacientes com IRC (ANNUK et al., 2001; GHIADONI et al., 2004; YILMAZ et al., 2006), sendo que a disfunção endotelial se agrava com a evolução dos estágios da IRC, estando os pacientes em terapia dialítica, classificados em IRT (estágio V), com pior função endotelial comparados a controles saudáveis ou a pacientes em estágios menos avançados (GHIADONI et al., 2004; YILMAZ et al., 2006).

## 1.6 Disfunção endotelial de pacientes em hemodiálise

A presença de disfunção endotelial mais pronunciada em pacientes com IRT em HD em relação a pacientes em diálise peritoneal (CROSS et al., 2001) vem despertando grande interesse para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos da disfunção endotelial de pacientes em HD, em especial, relacionando os efeitos da sessão de HD na função endotelial.

Entre os mecanismos de disfunção endotelial na IRC, observam-se uma elevação de 7,5 vezes nos níveis de ADMA em pacientes com IRT em HD comparados a controles saudáveis (VALLANCE et al., 1992; BOGER; ZOCCALI, 2003) e um aumento proporcional ao avanço dos estágios de IRC (YILMAZ et al., 2006). O acúmulo de ADMA é um importante fator de risco para doença cardiovascular, sendo considerado um forte e independente preditor de desfechos cardiovasculares adversos e de mortalidade global em pacientes de HD (ZOCCALI et al., 2001).

Cross et al. (2001) observaram que uma sessão de HD reduz os níveis de ADMA em pacientes com IRT, porém não se evidenciou correlação do nível desta substância com a vasodilatação mediada pelo fluxo. A possível razão disso é que a eliminação de ADMA durante a HD, induzindo ao aumento na produção/liberação de NO, não reflete necessariamente a biodisponibilidade do NO para a musculatura lisa vascular. No entanto, alguns estudos relatam uma redução não significativa nos níveis de ADMA após sessão de HD (MACALLISTER et al., 1996; KIELSTEIN et al., 1999), que poderia ser atribuída à forte ligação da ADMA com proteínas plasmáticas (BOGER; ZOCCALI, 2003).

Existe uma elevada prevalência de hiperhomocisteinemia em pacientes com IRC antes mesmo do início da diálise (MOUSTAPHA et al., 1998). A elevação de leve a moderada nos níveis de homocisteína (tHcy), um produto do metabolismo da metionina excretado pelo rim, é evidenciada em aproximadamente 85% dos pacientes de hemodiálise (LOVCIC et al., 2006) e considerada como um forte preditor de desfechos cardiovasculares (BOSTOM; LATHROP, 1997; MALLAMACI et al., 2002). Uma sessão de HD reduz os níveis de tHcy em pacientes com IRT (CROSS et al., 2001; ARNADOTTIR et al., 2002), porém não se identifica correlação entre os níveis de tHcy e a vasodilatação mediada pelo fluxo antes e depois da HD (CROSS et al., 2001).

Morris e Jardine (2000) referem o estresse oxidativo como o maior fator envolvido na disfunção endotelial de pacientes urêmicos e, em particular, de pacientes em HD, sendo considerado uma manifestação comum na IRC e um mediador de complicações cardiovasculares, neurológicas e outras (HIMMELFARB et al., 2002).

Alguns autores sugerem que a uremia é um estado pró-oxidante, com aumento nos níveis de lipoperoxidação representado pela elevação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e diminuição da atividade antioxidante (SCHETTLER et al., 1994; HIRAYAMA et al., 2000).

A deficiência funcional do NO na IRC é parcialmente causada pela inativação de NO mediada por ERO e pode ser evitada por terapia antioxidante (VAZIRI et al., 2002). Com a inativação de NO, o estresse oxidativo pode reduzir ainda mais a produção de NO e aumentar a geração de ERO pelo desacoplamento da eNOS e depleção de seus co-fatores, como a BH<sub>4</sub>, eventos que favorecem a geração de superóxido ao invés de NO pela eNOS. Outro efeito adverso do estresse oxidativo no metabolismo do NO ocorre pela *downregulation* da expressão da eNOS induzida pela IRC (VAZIRI et al., 1998).

Em um estudo recente foi observada redução de alguns sistemas de defesa antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e exacerbação de dano oxidativo (níveis elevados de malondialdeído e LDL oxidado) em pacientes com doença renal crônica comparados a controles, caracterizando níveis elevados de estresse oxidativo que progride em paralelo com a evolução dos estágios da doença renal crônica. Foi observada uma correlação positiva da FMD com a superóxido dismutase ( $r = 0,848$ ) e glutathione peroxidase ( $r = 0,836$ ). A FMD também se correlacionou negativamente com os níveis de malondialdeído plasmático ( $r = -0,836$ ) e de LDL oxidado ( $r = -0,813$ ) (YILMAZ et al., 2006). Em contradição a esses achados, Bolton et al. (2001) haviam mostrado que em pacientes renais crônicos a disfunção endotelial não está relacionada à oxidação de LDL, sugerindo que essa pode não ser a principal causa de disfunção endotelial nesses pacientes.

Em outro estudo envolvendo pacientes com IRC, a DDE correlacionou-se positivamente com a capacidade antioxidante total ( $r = 0,41$ ) e com glutathione reduzida ( $r = 0,44$ ), e negativamente com glutathione oxidada ( $r = -0,40$ ) e com a razão glutathione oxidada/glutathione reduzida ( $r = -0,47$ ) (ANNUK et al., 2001).

Esses achados indicam uma elevação na produção de ERO acompanhada de redução da capacidade antioxidante e a associação de DDE com estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica.

Tem sido sugerido que a hemodiálise por si só induz ao estresse oxidativo com espécies reativas de oxigênio sendo geradas na superfície da membrana de diálise pela ativação de leucócitos polimorfonucleares (HOENICH, 1999). Uma das teorias preconizadas é que a lipoperoxidação ocorre durante a diálise devido à ativação de células inflamatórias causadas pela bioincompatibilidade das membranas de diálise, ocasionando a ativação de

lipopolissacarídeos e de citocinas inflamatórias (WRATTEN et al., 2000). Além disso, o estresse oxidativo em pacientes com IRC tem sido atribuído aos efeitos da interação sangue/dialisador, reação com cateteres e fístula artério-venosa, sobrecarga de ferro, infecções crônicas, distúrbios imunológicos e metabólicos e citocinas pró-inflamatórias (VAZIRI, 2004).

Miyazaki et al. (2000) referiram que a sessão de HD utilizando um dialisador com membrana de celulose aumentou em 35% os níveis de LDL oxidado, os quais não se alteraram pela utilização de um dialisador revestido com Vitamina E. No entanto, outros autores não encontraram alterações nos níveis de LDL-oxidado após sessão de HD, independentemente da membrana do dialisador utilizada. Porém, a diálise com membrana de cuprofana reduziu as concentrações plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E), enquanto a utilização de membrana de polisulfona não alterou os níveis desta substância (KOSCH et al., 2003).

A constante condição de inflamação sistêmica presente em pacientes renais crônicos, a qual está diretamente associada com o estresse oxidativo elevado, com a disfunção endotelial e com a ativação hemostática, emerge como o maior fator de risco cardiovascular nesse grupo de pacientes (MEZZANO et al., 2001). Tem sido documentado que marcadores inflamatórios de fase aguda, como a elevação de PCR (YEUN et al., 2000), de fibrinogênio, de lipoproteínas e a baixa concentração de albumina (ZIMMERMANN et al., 1999) são todos diretos e independentes preditores de doença cardiovascular em pacientes de hemodiálise. Esses achados demonstram que a associação entre inflamação e aterosclerose é particularmente forte nessa população (BORAWSKI et al., 2001).

Uma sessão de HD promove exacerbação da resposta inflamatória pelo aumento nos níveis de marcadores inflamatórios como PCR (POYRAZOGLU et al., 2006; CIACCIO et al., 2007), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (POYRAZOGLU et al., 2006) e fibrinogênio (CIACCIO et al., 2007). No entanto, a utilização de heparina de baixo peso molecular não alterou os níveis de PCR e fator de necrose tumoral- $\alpha$  e pode apresentar-se como uma alternativa anticoagulante durante a HD (POYRAZOGLU et al., 2006).

Diante dessas condições, a sessão de HD exerce efeitos opostos na função endotelial, ou seja, a redução de ADMA, inibidora direta da eNOS, e de tHcy que danifica diretamente o endotélio e está implicada na geração de espécies reativas de oxigênio, poderiam influenciar na melhora da função endotelial após a HD, porém, a exacerbação nos níveis de estresse

oxidativo e a ativação de respostas inflamatórias induzem o agravamento da disfunção endotelial.

Outro achado de grande interesse na abordagem da disfunção endotelial de pacientes com IRC é o fato de que a eritropoietina, droga amplamente utilizada no tratamento da anemia desses pacientes, apresenta-se como um potente estímulo fisiológico na mobilização de células endoteliais progenitoras (HEESCHEN et al., 2003).

No que se refere ao comportamento da função endotelial diante de uma sessão de HD, vêm sendo observados resultados conflitantes, sendo que alguns estudos relatam melhora da função endotelial, outros referem que a HD não promove alterações e outros descrevem a piora da função endotelial após a HD.

Em um estudo avaliando a função endotelial antes e depois da HD, e então sequencialmente 2 h, 5 h e 24 h após a sessão, foi observada melhora da função endotelial após a HD que persistiu durante 5 h e que retornou aos níveis anteriores à HD em 24 h (CROSS et al., 2001). Em outro estudo avaliando três diferentes formas de HD (4 h de HD, 8 h de HD, 8 h de HD com um dialisador menor e com fluxo lento) foi observada melhora da função endotelial após sessão de HD em todas as modalidades de tratamento, sem diferença entre elas (MCGREGOR et al., 2003).

No entanto, Migliacci et al. (2004) não identificaram alteração da função endotelial, de nitritos e nitratos e de guanosina monofosfato cíclico após sessão de HD, embora tenha sido observada uma redução de tHcy e de produtos finais da glicosilação avançada.

A membrana do dialisador pode ser determinante para as alterações na função endotelial durante a sessão de HD. O dialisador com membrana de polisulfona não altera a FMD (KOSCH et al., 2001; KOSCH et al., 2003), enquanto o dialisador com membrana de cuprofana reduz a FMD após a sessão de HD (KOSCH et al., 2003).

Em outro estudo foi observado que a sessão de HD utilizando um dialisador com membrana de celulose reduz a FMD, a qual não se altera pela utilização de um dialisador revestido com Vitamina E. Além disso, essa piora da função endotelial representada por redução da FMD correlacionou-se inversamente ( $r = -0,53$ ) com os níveis de LDL oxidado. Esses achados propõem que a sessão de HD prejudica a função endotelial via aumento nos níveis de estresse oxidativo (MIYAZAKI et al., 2000). No entanto, esses investigadores avaliaram apenas uma medida de dano oxidativo (LDL oxidado) e desconsideraram a avaliação de pelo menos uma medida de defesa antioxidante, impossibilitando a avaliação do desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes que por definição caracterizaria o estresse oxidativo e poderia induzir a alteração na função endotelial. Os efeitos da sessão de HD na

função endotelial também foram avaliados em crianças ( $11,4 \pm 3,2$  anos) com IRT, sendo observada redução da FMD após a HD (LILIEN et al., 2005).

Todos esses trabalhos foram conduzidos com avaliação da função endotelial no leito arterial. No entanto, as veias oferecem uma oportunidade singular para estudos diretos de ações e interações de estímulos fisiológicos e farmacológicos no leito vascular humano *in vivo* devido ao fácil acesso, às baixas pressões intravasculares, à parede vascular fina e à sua distensibilidade. Além disso, é importante salientar que embora a resistência venosa contribua muito pouco para a resistência periférica total, em torno de 2/3 do volume de sangue está contido nas veias (AELLIG, 1994).

A avaliação do leito vascular venoso em pacientes com IRT pode ser um método mais sensível para detecção de alterações da função endotelial diante de uma sessão de HD, visto que o sistema venoso de capacitância pode ser mais influenciado pela grande remoção de fluidos e eletrólitos durante a diálise. Além disso, a hipotensão relacionada à diálise parece ser predominantemente mediada pelas mudanças no sistema vascular de capacitância (KOOMAN et al., 1994). A investigação das veias da mão evita fatores de confusão tais como a hipertrofia vascular e outras mudanças estruturais que podem ocorrer em vasos de resistência de pacientes com hipertensão e diabetes, fatores causais predominantes em pacientes com IRT (HAYNES et al., 1994).

Baseados nessas observações, Hand et al. (1998), em um único estudo referido na literatura avaliando o leito vascular venoso diante de uma sessão de HD, observaram que a resposta de venodilatação dependente do endotélio estava reduzida antes da HD em relação a controles saudáveis. Além disso, mostraram que a HD melhorou a resposta de venodilatação e que após a HD a função endotelial dos pacientes com IRT não diferiu do grupo controle.

Diante dos estudos mencionados, notam-se controvérsias quanto aos efeitos agudos de uma sessão de HD sobre o estresse oxidativo e a função endotelial em pacientes com IRT, além da escassez de trabalhos englobando a associação dessas variáveis diante de uma sessão de HD. Ao nosso conhecimento, até a presente data não haviam sido realizados estudos avaliando a associação da função endotelial venosa e do estresse oxidativo frente a uma sessão de HD em pacientes com IRT.

## **1.7 Disfunção endotelial no diabetes tipo 2**

O número de pessoas com diabetes está aumentando devido ao crescimento da população, idade avançada, urbanização e a elevada prevalência de obesidade e inatividade

física. A prevalência de diabetes em toda a população mundial foi estimada em 2,8% no ano de 2000 (171 milhões de pessoas) e está projetada em 4,4% em 2030 (366 milhões de pessoas). No Brasil, o número estimado de pessoas com diabetes foi de 4,6 milhões no ano de 2000, com projeção para 11,3 milhões de pessoas no ano de 2030. No ano de 2000 essas estimativas colocavam o Brasil em oitavo lugar no *ranking* mundial de casos de diabetes, no entanto, o país deverá ocupar a sexta posição no ano de 2030 (WILD et al., 2004).

O diabetes mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, caracterizando-se por hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. Há muitos anos o DM2 vem sendo associado com elevada morbidade e mortalidade cardiovasculares, manifestando-se por doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e doença vascular periférica (KANNEL; MCGEE, 1979).

A proposta de que a disfunção endotelial precede o DM2 surge diante da observação de que mesmo em indivíduos normoglicêmicos com propensão ao DM2 e resistência à insulina, a hiperglicemia aguda, induzida por um teste oral de tolerância à glicose, inibe a DDE (KAWANO et al., 1999).

Vários estudos demonstram a presença de disfunção endotelial em pacientes com DM2 comparados a indivíduos saudáveis, representada pela DDE reduzida na artéria braquial (IHLEMANN et al., 2002; HENRY et al., 2004; YU et al., 2004; BECKMAN et al., 2007) e pela redução na resposta de vasodilatação na veia dorsal da mão (HARADA et al., 1999).

Uma série de eventos tem sido proposta para explicar a disfunção endotelial no DM2. Em um estudo propondo um modelo de avaliação da cinética L-arginina-NO *in vivo*, foi observada que a fração de L-arginina que é convertida a NO está reduzida em pacientes com DM2 em relação a indivíduos saudáveis (AVOGARO et al., 2003b). Somado a isso, as duas principais vias de sinalização do receptor de insulina estão alteradas, promovendo uma *downregulation* da fosforilação e ativação da eNOS (MONTAGNANI et al., 2002).

A hiperglicemia crônica é apontada como a principal iniciadora das complicações microvasculares no diabetes (ex., retinopatia, neuropatia, nefropatia) (SHEETZ; KING, 2002) e promove a redução da DDE (HOGIKYAN et al., 1998; CABALLERO et al., 1999). A resistência à insulina, níveis elevados de ácidos graxos livres e a hiperglicemia produzem estresse oxidativo que está associado à disfunção endotelial e às complicações diabéticas clinicamente evidenciadas. Isso indica que o estresse oxidativo exerce um papel crucial na patogênese das complicações diabéticas tardias (EVANS et al., 2002). Diante dessas observações, Brownlee (2005) relatou que a correção terapêutica da produção de ânion

superóxido induzida pelo diabetes pode representar uma abordagem nova e poderosa para prevenir as complicações diabéticas.

A hiperglicemia e o aumento de ácidos graxos livres induzem à elevação de ERO mitocondriais e conseqüente estresse oxidativo. Essa seqüência de eventos produz a ativação das vias de sinalização induzidas por estresse, incluindo NF- $\kappa$ B (NISHIKAWA et al., 2000), proteína quinase ativada por mitógeno p38 e Jun quinase NH<sub>2</sub>-terminal/proteína quinase ativada por estresse, seguidas da ativação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)/receptor de AGEs (BUCALA et al., 1991; NISHIKAWA et al., 2000), da proteína quinase C (PKC) (COSENTINO et al., 2003), da elevação da produção de sorbitol, de citocinas e prostanóides (NISHIKAWA et al., 2000). A ativação das vias de sinalização induzidas por estresse aumentam a resistência à insulina e a disfunção das células  $\beta$ . O aumento de citocinas e prostanóides também promovem disfunção das células  $\beta$ . Diante dessa cascata de sinalização, existem evidências de que a ativação das mesmas vias de estresse pela hiperglicemia e pela elevação de ácidos graxos livres promovem tanto a resistência à insulina quanto a secreção de insulina prejudicada e, conseqüentemente, o desenvolvimento das complicações diabéticas (EVANS et al., 2002).

Como principal fonte de ERO e de indução do estresse oxidativo, a NAD(P)H oxidase eleva-se não somente pela exposição a fatores que promovem dano vascular, mas também pela própria insulina (CEOLOTTI et al., 2004; GOLDSTEIN et al., 2005) e pela sua elevada expressão gênica em linfomonócitos circulantes de pacientes com DM2, sendo essa elevação dependente do controle metabólico (AVOGARO et al., 2003a).

Os AGEs se acumulam na parede dos vasos expostos à hiperglicemia, alteram a integridade estrutural da parede vascular e neutralizam o NO, afetando substancialmente a função endotelial (SHEETZ; KING, 2002). A ativação da PKC pela hiperglicemia promove a inibição da eNOS, vasodilatação pelo NO reduzida e liberação de ET-1 elevada (SHEETZ; KING, 2002). A ativação da PKC também modula a superexpressão de moléculas de adesão como a VCAM, ICAM e selectina-E, além de sua atuação como mediadora na contratilidade da célula muscular lisa vascular em resposta à hiperglicemia (AVOGARO et al., 2006).

Além do aumento de ERO em pacientes com DM2, ocorre redução da capacidade antioxidante total (COLAK et al., 2005) e dos sistemas de defesa não enzimáticos como Vitamina-C e Vitamina-E (KNAPIK-KORDECKA et al., 2007). Quanto aos sistemas antioxidantes enzimáticos, pacientes com DM2 apresentam reduzidos níveis de superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase (COLAK et al., 2005) e catalase (GOTH; EATON, 2000; GOTH et al., 2001).

Outra situação induzindo a disfunção endotelial no DM2 é a agressão do endotélio por leucócitos circulantes diante da produção elevada de ERO (LIBBY, 2002), desencadeando um processo inflamatório marcado pela produção de PCR hepática a qual promove uma *downregulation* da transcrição da eNOS e desestabiliza o RNA mensageiro da eNOS, com conseqüente redução na liberação de NO basal ou estimulado (RATNAM; MOOKERJEA, 1998). No entanto, apesar da associação entre inflamação e disfunção endotelial em populações não diabéticas, alguns estudos têm demonstrado que a PCR não se correlaciona com função vascular em indivíduos diabéticos (WOODMAN et al., 2002; NYSTROM et al., 2005), porém esse marcador pode não representar todos os marcadores inflamatórios (BECKMAN et al., 2007).

A concentração circulante de ADMA está aumentada em pacientes com elevado risco cardiovascular e a sua elevação aguda, através de uma refeição rica em gordura, reduz a DDE em pacientes com DM2 (FARD et al., 2000). A ADMA prediz eventos cardiovasculares em pacientes com DM2 (KRZYZANOWSKA et al., 2007) e está associada com doença macrovascular, independentemente de hiperhomocisteinemia ou de outros fatores de risco cardiovasculares tradicionais (KRZYZANOWSKA et al., 2006).

Além desses mecanismos envolvidos na disfunção endotelial do DM2, as células endoteliais progenitoras estão relacionadas aos eventos precoces e tardios das doenças cardiovasculares e encontram-se reduzidas em pacientes com DM2 (FADINI et al., 2005), sendo esse um achado recente para explicar a associação de DM2 com disfunção endotelial e neovascularização reduzida nesses pacientes.

## **1.8 Microalbuminúria e disfunção endotelial no diabetes tipo 2**

A microalbuminúria, definida como uma taxa de excreção urinária de albumina (EUA)  $\geq 30$  mg/24h, mas menor do que 300 mg/24h, é um forte preditor de nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (VIBERTI et al., 1982) e com DM2 (MOGENSEN, 1984) e também de todas as causas de mortalidade cardiovascular em diabéticos (MOGENSEN, 1984) e não-diabéticos (DAMSGAARD et al., 1990). No DM2 existe uma forte associação entre microalbuminúria e risco de doença cardiovascular, a qual é independente de fatores de risco convencionais como hipertensão e tabagismo (DINNEEN; GERSTEIN, 1997).

A nefropatia diabética acomete 40% dos pacientes com DM2, está associada a um aumento da mortalidade cardiovascular e é a principal causa de IRT nos Estados Unidos da

América, além de ser responsável por 26,5% dos novos casos de diálise na região metropolitana de Porto Alegre (GROSS et al., 2005).

Através de um estudo longitudinal em pacientes com DM2 pelo período de 10 anos indicou-se a possibilidade de que a disfunção endotelial causa um aumento na atividade inflamatória, possivelmente através da produção de citocinas pró-inflamatórias e, assim, potencialmente criando um ciclo vicioso de atividade inflamatória e disfunção endotelial. Fatores de risco convencionais, especialmente obesidade e pobre controle glicêmico, podem aumentar o risco de morte, parcialmente explicado pela disfunção endotelial, atividade inflamatória elevada e microalbuminúria. Esses fenômenos estão inter-relacionados, progredem com o tempo e são fortemente e independentemente associados com o risco de morte (STEHOUWER et al., 2002).

A microalbuminúria pode refletir um estado de dano vascular generalizado, como mencionado por Deckert et al. (1989), e referido como a *Steno hypothesis* (DECKERT et al., 1989). Pacientes com microalbuminúria apresentam disfunção endotelial generalizada, mas desde a observação de que a disfunção endotelial precede o desenvolvimento de microalbuminúria (STEHOUWER et al., 1995), ambas as condições não podem ser referidas como um distúrbio único. A microalbuminúria pode refletir um dano vascular subclínico nos rins e em outros leitos vasculares, mas também pode representar disfunção endotelial sistêmica que predispõe futuros eventos cardiovasculares (WEIR, 2007).

Em um estudo recente, Murussi et al. (2007) analisaram os fatores de risco para o desenvolvimento de micro- e macroalbuminúria e taxas de mortalidade em um seguimento de  $8 \pm 3$  anos em 193 pacientes com DM2 e normoalbuminúria (taxa de EUA  $< 30$  mg/24h). Os principais preditores de mortalidade nesta coorte foram os níveis mais elevados de EUA, sexo masculino, idade e glicemia de jejum. Os mais altos níveis de EUA, a presença de retinopatia diabética, a glicemia de jejum e sexo masculino foram os principais preditores de micro- e macroalbuminúria. Nesse grupo de pacientes, o desenvolvimento de micro- e macroalbuminúria e as taxas de mortalidade foram independentemente e positivamente associados com os mais altos níveis de EUA, mesmo diante de valores considerados normais.

Alguns estudos têm demonstrado níveis de disfunção endotelial mais pronunciados em pacientes com DM2 associado à microalbuminúria do que em pacientes com normoalbuminúria, sendo que a maioria deles vem utilizando o método de ultrasonografia de alta resolução para medida de vasodilatação da artéria braquial. Yu et al. (2004) avaliaram 12 pacientes com normoalbuminúria e 12 com microalbuminúria, observando que os pacientes com microalbuminúria apresentaram uma tendência à disfunção endotelial mais pronunciada

e à elevação plasmática do vWf (diferenças não-significativas). Esses pacientes também apresentaram maior resistência à insulina, maiores níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e de PAI-1 do que os normoalbuminúricos. Em outro estudo foram observados níveis elevados de vWf em pacientes com DM2 e dislipidemia comparados a pacientes não diabéticos com hipercolesterolemia, sendo esta alteração associada com níveis normais de albuminúria (SELIGMAN et al., 2000).

Em outro estudo comparando 115 pacientes normoalbuminúricos e 28 microalbuminúricos, foi avaliada a DDE a 1 min e a 3 min após a liberação do fluxo na artéria braquial, observando que pacientes com microalbuminúria apresentaram menor vasodilatação em ambas as medidas, tendo a microalbuminúria se mostrado como um preditor independente de disfunção endotelial em pacientes com DM2. Nesse estudo também foi observada uma menor resposta de DIE no grupo microalbuminúrico, o que sugere disfunção da musculatura lisa vascular (PAPAIOANNOU et al., 2004).

Em estudo recente, Makino et al. (2008) avaliaram 121 pacientes normoalbuminúricos, 71 microalbuminúricos e 25 macroalbuminúricos, e observaram DDE reduzida nos pacientes micro- e macroalbuminúricos comparados aos normoalbuminúricos, no entanto, a DIE não diferiu entre os grupos. Os níveis de vWf, de PCR e de ADMA não diferiram entre normo- e microalbuminúricos. Foi também evidenciada uma correlação negativa ( $r = -0,38$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 192$ ) entre a EUA e a DDE. No entanto, nesse estudo foram incluídos pacientes com longo período de diabetes ( $> 12$  anos) e mau controle glicêmico (hemoglobina glicada  $> 7,5\%$ ). Além disso, o grupo com microalbuminúria apresentou pior controle glicêmico do que os pacientes normoalbuminúricos.

Em pacientes com DM2, a comparação da função endotelial entre normo- e microalbuminúricos também tem sido avaliada por angiografia coronariana quantitativa para medir a resposta da artéria coronária diante do teste pressórico ao frio, observando que pacientes com microalbuminúria apresentaram maior nível de disfunção endotelial coronariana do que os normoalbuminúricos, estando a DDE inversamente correlacionada com a EUA ( $r = -0,39$ ) (COSSON et al., 2006).

Estudos comparando a função endotelial no leito vascular venoso entre pacientes com DM2 normoalbuminúricos *versus* microalbuminúricos não foram descritos até o momento, bem como a busca de uma possível correlação entre respostas de vasodilatação entre leito venoso e arterial não tem sido investigada em pacientes com DM2. Além disso, as respostas de vasodilatação através da infusão de acetilcolina (venodilatação mediada por receptor muscarínico) intravenosa não têm sido relatadas nesses pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a função endotelial de pacientes com IRT em resposta à sessão de HD e de pacientes com DM2 e microalbuminúria.

### 2.2 Objetivos específicos

Esse trabalho foi constituído de dois estudos independentes envolvendo pacientes com insuficiência renal terminal (Estudo 1) e pacientes com DM2 (Estudo 2) e, portanto, os objetivos específicos estão descritos em separado.

#### Estudo 1:

- Analisar a influência de uma sessão de HD na função endotelial venosa de pacientes com IRT;
- Avaliar os efeitos de uma sessão de HD sobre o estresse oxidativo de pacientes com IRT;
- Investigar a correlação entre função endotelial venosa e medidas de estresse oxidativo em resposta à sessão de HD nestes pacientes.

#### Estudo 2:

- Avaliar e comparar a função endotelial entre pacientes com DM2 normoalbuminúricos e microalbuminúricos no leito venoso e arterial;
- Investigar a correlação entre função endotelial e variáveis bioquímicas;
- Analisar a correlação das respostas de vasodilatação entre o endotélio venoso e arterial.

### 3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

A apresentação dessa tese foi elaborada conforme o regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia / UFRGS, pela compilação de artigos científicos, sendo um aceito (no prelo; ANEXO A) no periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Estudo 1) e outro submetido (ANEXO B) ao periódico *Diabetes Care* (Estudo 2). Os artigos científicos estão apresentados na íntegra e em inglês, conforme normas das revistas às quais foram enviados, no capítulo de Resultados.

Ambos os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e todos os voluntários leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXOS C e D).

O Estudo 1, intitulado “Hemodialysis improves endothelial venous function in end-stage renal disease”, foi realizado com nove pacientes (três homens) portadores de IRT, em programa regular de HD na Unidade de Nefrologia do HCPA. O grupo controle foi composto de dez indivíduos saudáveis pareados em sexo e idade. Foram avaliadas a função endotelial venosa, estresse oxidativo e medidas laboratoriais antes e depois de uma sessão de HD e no grupo controle em um único momento.

No Estudo 2, intitulado “Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes”, foram selecionados 28 pacientes com DM2, em tratamento na zona de 16 do HCPA, subdivididos em dois grupos: grupo normoalbuminúrico (n = 16; excreção de albumina urinária < 30 mg/24 h; 8 homens) e grupo microalbuminúrico (n = 12; excreção de albumina urinária entre 30 e 299 mg/24 h; 8 homens). Foram analisadas a função endotelial venosa, a função endotelial arterial e as medidas laboratoriais.

As avaliações da função endotelial ocorreram na Unidade de Hemodiálise (Estudo 1) e no Laboratório Cardiovascular (Estudo 2) do HCPA. A função endotelial venosa foi avaliada pela mesma técnica em ambos os estudos conforme descrito a seguir.

#### 3.1 Avaliação da função endotelial venosa

A função endotelial venosa foi avaliada no membro superior contralateral à fistula artério-venosa dos pacientes com IRT (Estudo 1) e no membro superior não-dominante do grupo controle (Estudo 1) e dos pacientes com DM2 (Estudo 2), sempre pelo mesmo investigador. A avaliação ocorreu pela técnica de *dorsal hand vein* (Ilustração 1), previamente

descrita por Aellig (1981), e recentemente utilizada por nosso grupo (SIGNORI et al., 2008). Inicialmente, um cateter borboleta número 23 foi inserido em uma veia do dorso da mão, com o braço posicionado a um ângulo de 30 graus, e iniciada a infusão contínua de solução fisiológica (0,9 %) durante 30 minutos. A velocidade de infusão de todas as soluções foi de 0,3 ml/min. Um transdutor (LVDT, Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ), capaz de detectar pequenos deslocamentos lineares, foi colocado sobre a superfície dorsal da mão e afixado firmemente à pele (Ilustração 2). Um pino metálico, o qual deslizava através do transdutor, foi posicionado com uma de suas extremidades sobre a veia a ser estudada, a 1 cm da ponta do cateter utilizado para as infusões. O deslocamento vertical desse pino, de acordo com o grau de dilatação ou constrição da veia, gerava um sinal no transdutor que era amplificado e registrado. Medidas do calibre da veia por este método foram realizadas após insuflação de um manguito de esfigmomanômetro a 40 mmHg colocado no mesmo braço. Após a infusão da solução fisiológica foi medida a vasodilatação basal (relaxamento de 100%). Após, foi infundido cloridrato de fenilefrina (Winthrop Lab, New York, USA) a uma concentração progressiva entre 25 - 8.333,3 ng/min (7 min/dose; ANEXO E), diluído em solução fisiológica, sendo objetivada uma vasoconstrição de 70% da medida basal (esse grau de pré-constrição foi definido como venodilatação de 0%). Para a avaliação da venodilatação dependente do endotélio foram infundidas doses crescentes de acetilcolina (Divisão de Farmácia da Universidade de São Paulo, Brasil) a uma concentração de 3,6 - 3.600 ng/min (ANEXO F), durante 3 min/dose, diluídas em solução fisiológica e combinada a dose de cloridrato de fenilefrina correspondente a ED<sub>70</sub> (ANEXO G). Na medida de DIE, a mesma concentração de cloridrato de fenilefrina foi diluída em solução fisiológica e combinada ao nitroprussiato de sódio (Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, Brasil) a uma concentração crescente de 495,3 - 990,6 ng/min (ANEXO H) e cada dose infundida durante 3 min. A temperatura ambiente foi mantida constante entre 21 ± 1 °C. A frequência cardíaca e pressão arterial foram monitoradas no início e ao final do experimento e a cada nova dose administrada.



Ilustração 1 - Sistema de avaliação pela técnica de *Dorsal Hand Vein*.



Ilustração 2 - Transdutor para avaliação da função endotelial venosa.

### 3.2 Avaliação da função endotelial arterial

A avaliação da função endotelial arterial, ocorrida somente no Estudo 2, foi conduzida conforme descrito por Corretti et al. (2002). As medidas foram feitas pelo mesmo avaliador que permaneceu “cego” quanto à taxa de EUA de cada paciente. Foi utilizado um aparelho de ultrasonografia de alta resolução (EnVisor CHD, Philips, Bothell, WA, USA) e um transdutor de alta frequência (3-12 MHz; L12-3, Philips, Bothell, WA, USA) para obter imagens longitudinais da artéria braquial (Ilustração 3). As imagens de diâmetro arterial com traçado eletrocardiográfico simultâneo e de Doppler pulsado foram gravadas em CD. Para minimizar erros operacionais, tanto o transdutor quanto o braço foram posicionados e mantidos na

mesma posição durante o procedimento, garantindo que as imagens fossem captadas no mesmo segmento arterial. Imagens do diâmetro arterial no modo bidimensional e do fluxo basal pelo Doppler foram gravadas com os indivíduos após 10 min de repouso. A artéria braquial foi ocluída durante 5 min com um manguito de pressão posicionado no antebraço e insuflado a 50 mmHg acima da pressão sistólica. Procedendo-se a medida de DDE em resposta ao *shear stress* e à hiperemia reativa, foram novamente captadas imagens do diâmetro arterial entre 45 e 60 s e do fluxo hiperêmico nos primeiros 15 s após a liberação do manguito. Após 10 min de repouso as imagens basais foram repetidas e foi administrado um spray de nitroglicerina sublingual (dose: 0,4 mg; Natispray Trinitrite, Procter & Gamble Pharmaceutics, France) para avaliar as respostas vasodilatadoras independentes do endotélio após 4 min. As análises foram realizadas *off-line*, procedendo-se a mensuração do diâmetro da artéria braquial, usualmente no final da diástole (no pico da onda R do eletrocardiograma). As mensurações foram feitas em vários pontos ao longo do vaso utilizando o sistema de medidas do próprio aparelho. As respostas de DDE e DIE foram expressas como variação percentual do diâmetro da artéria braquial, sendo considerado como parâmetro de normalidade um valor de dilatação  $\geq 8\%$  (GAENZER et al., 2001; GOKCE et al., 2003).



Ilustração 3 - Avaliação da função endotelial arterial por ultrasonografia

### 3.3 Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada somente no Estudo 1 e consistiu na medida de oxidação das proteínas (método das carbonilas) como uma medida de dano tecidual e na avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP) como uma medida de defesa. As

análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio da UFRGS. O sangue foi centrifugado em meio refrigerado durante 15 minutos a 3000g (Sorval RC 5b-rotor SM 24, Du pont Instruments, Norwalk, Connecticut) e o plasma foi guardado separadamente. As células vermelhas foram lavadas três vezes em solução salina (NaCl 0,9%), acondicionadas em solução para enzimas antioxidantes e guardadas em freezer a -80°C.

A medida de carbonilas foi realizada de acordo com o método descrito por Reznick & Packer, 1994. O método consiste na reação da dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as carbonilas das proteínas formando hidrazonas que podem ser medidas espectrofotometricamente. Para a realização do experimento foram utilizados os reagentes: Guanidina (PM 95,53): 5,73 g em 10 mL de HCl (2,5M) pH 2,5; 2,4 DNPH: 19,8 mg em 10 mL de HCl 2,5 M; ácido tricloroacético (TCA) 20% P/V; TCA 10% P/V; Etanol – acetato de etila 1:1 (V/V). Para realização da curva de albumina foi utilizado: 0,2 mg albumina/0,4 mL de guanidina corresponde a 0,5 mg/mL; 0,4 mg albumina/0,4 mL de guanidina corresponde a 1 mg/mL; 0,6 mg albumina/0,4 mL de guanidina corresponde a 1,5 mg/mL.

Inicialmente foi adicionado 0,8 mL de DNPH com 0,2 mL de plasma para a reação do DNPH com as carbonilas da amostra. Para cada amostra, utilizou-se outro tubo para medida de proteína total da amostra. Esse tubo foi utilizado como “branco”, e as concentrações utilizadas foram as mesmas para medida das carbonilas. Ainda nesse tubo colocou-se 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de HCl 2,5 M. Os tubos foram incubados por uma hora, em local escuro e agitados a cada 15 minutos. A partir da primeira etapa, as demais foram realizadas da mesma forma, tanto para os tubos onde foi utilizado DNPH, quanto para os tubos onde foram avaliadas as proteínas. Após foi adicionado 1mL de solução de TCA 20% em ambos os tubos. Esses foram colocados no gelo por 10 min e após centrifugados por 5 min em centrífuga refrigerada a 3000 rpm. Aproveitou-se o precipitado e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, acrescentou-se 0,8mL de TCA 10% ao precipitado agitando-se mecanicamente com bastão de vidro, centrifugando por cinco minutos e, finalmente, o precipitado foi lavado por três vezes com 0,8 mL de etanol – acetato de etila para remover o DNPH livre e lipídios contaminantes. O precipitado final foi dissolvido em 0,4 mL de guanidina 6 M e agitado por 10 min à 37 °C. O material insolúvel foi removido por centrifugação adicional. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 360 nm. A proteína total da amostra foi lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. Para calcular proteína utilizou-se uma curva padrão de albumina bovina, dissolvida em guanidina 6 M, medida em

espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteínas.

A medida de TRAP consiste em incubar uma mistura de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) (ABAP - 10 mM), usado como uma fonte de radicais livres, com luminol (10  $\mu$ M) em tampão glicina (0,1 mM - pH 8,6). Essa mistura foi levada ao contador (espectrômetro de cintilação LKB: 1215; Bromma, Suécia) e a luminescência surgiu da oxidação do luminol pelos radicais livres. A adição de trolox (vitamina E hidrossolúvel) reduz quase que completamente a emissão de luz, demonstrando um tempo de indução que está linearmente relacionado com a concentração de trolox (LISSI et al., 1992). Foi elaborado uma curva de calibração com trolox nas concentrações de 0,2 à 1  $\mu$ M. O homogeneizado de tecido (entre 25 a 45 $\mu$ l) foi adicionado em substituição ao trolox e observou-se o tempo de indução dos radicais livres. A quantidade total de antioxidantes presente no tecido foi avaliada por interpolação da medida do tempo de indução de uma dada quantidade de homogeneizado na curva de calibração obtida com o trolox (EVELSON et al., 2001). Os valores foram expressos em unidades de trolox por microlitro de plasma (U trolox/ $\mu$ l).

### 3.4 Medidas laboratoriais

Os exames laboratoriais foram realizados no Serviço de Patologia Clínica e no Serviço de Hemoterapia do HCPA. Os métodos de avaliação em cada exame foram os mesmos, no entanto, alguns foram solicitados somente para o 2º Estudo. Nas primeiras horas da manhã, na zona 14 do HCPA, foram coletadas as amostras de sangue venoso após jejum de 12 h e entregues os frascos com a coleta de urina de 24 h.

A excreção urinária de albumina foi determinada por imunoturbidimetria (MicroAlb; Ames-Bayer, Tarrytown, NY, USA). O vWf foi medido em amostras em duplicata por ELISA (Asserachrom vWf; Diagnostica Stago, France). A glicose plasmática foi mensurada por método enzimático colorimétrico glicose-peroxidase (Biodiagnóstica, Pinhais, Brasil). Colesterol total, colesterol-HDL e triglicerídeos foram medidos por método colorimétrico e a hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) por cromatografia líquida de alta *performance* (Merck-Hitachi L-9100; Merck, Darmstadt, Germany). O LDL-c foi calculado pela fórmula de Friedwald. A creatinina plasmática e urinária foram determinadas pelo método Jaffé. A insulina plasmática foi determinada por *kits* de enzima imunoensaio (Abbot-Murex, Park, IL, USA) e a PCR ultrasensível por nefelometria. As medidas de hematócrito e hemoglobina foram realizadas através de métodos padronizados que compõem a rotina do laboratório.

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados conforme quadro abaixo:

<b>Título do artigo</b>	<b>Periódico</b>
Hemodialysis improves endothelial venous function in end-stage renal disease.	Aceito (no prelo): <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes.	Submetido para: <i>Diabetes Care</i>

#### **4.1 Estudo 1: Hemodialysis improves endothelial venous function in end-stage renal disease**

##### **Hemodialysis improves endothelial venous function in end-stage renal disease**

A.M.V. Silva<sup>1,2</sup>, L.U. Signori<sup>3</sup>, R.D.M. Plentz<sup>3</sup>, H. Moreno Jr<sup>4</sup>, E. Barros<sup>1</sup>, A. Belló-Klein<sup>1</sup>, B.D. Schaan<sup>3</sup>, M.C. Irigoyen<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia e Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Educação Física e Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Investigação Clínica, Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Farmacologia Cardiovascular, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil

<sup>5</sup> Unidade de Hipertensão, Instituto do Coração, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Endothelial venous function and oxidative stress in ESRD

Key words: ESRD, hemodialysis, oxidative stress, vascular endothelium.

Research supported by CAPES and FIPE/HCPA.

Address for correspondence:

B.D. Schaan. Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Unidade de Pesquisa.

Avenida Princesa Isabel, 370. Santana.

90620-001 Porto Alegre, RS, Brasil.

Fone: 51-3223-2746. Fax: +55-51-3219-2802 Ext 21/24

E-mail: [beatrizschaan@gmail.com](mailto:beatrizschaan@gmail.com)

**Abstract**

This study aimed to investigate the acute effect of hemodialysis (HD) upon endothelial venous function and oxidative stress. We studied 9 patients with end-stage-renal disease (ESRD),  $36.8 \pm 3.0$  yrs-old, before and after an HD session, and 10 healthy controls. Endothelial function was assessed by the dorsal hand vein technique using graded local infusion of acetylcholine (endothelium-dependent venodilation - EDV) and sodium nitroprusside (endothelium-independent venodilation - EIV). Oxidative stress was evaluated by measuring oxidative damage (carbonyls) and antioxidant defense (total radical trapping antioxidant potential - TRAP). EDV was lower in ESRD patients before HD ( $65.6 \pm 10.5$ ) vs controls ( $109.6 \pm 10.8$ ;  $P = 0.010$ ) and vs after HD ( $106.6 \pm 15.7$ ;  $P = 0.045$ ). EIV was similar in all comparisons performed. The HD session decreased TRAP ( $402.0 \pm 53.5$  vs  $157.1 \pm 28.3$  U of Trolox/ $\mu$ L plasma;  $P = 0.001$ ). No protein damage was observed comparing ESRD patients before vs after HD ( $P = 0.389$ ). The magnitude of change in the EDV was negatively correlated with the magnitude of change in TRAP ( $r = -0.70$ ;  $P = 0.037$ ). These results suggest that a HD session improves endothelial venous function, in association with an antioxidant effect.

## **Introduction**

Patients with end-stage renal disease (ESRD) experience excess morbidity and mortality due to cardiovascular disease (CVD). These patients usually have several classical CVD risk factors, but this does not fully explain their excessive CVD mortality (1). Among the emerging CVD risk factors, endothelial dysfunction and oxidative stress are currently emphasized, not only because they could explain the high incidence of CVD events in the ESRD population compared with the general population (2), but also because they may be new targets for therapeutic interventions.

Impaired endothelium-dependent vasodilation is extensively described in patients with ESRD undergoing renal replacement therapy by hemodialysis (3-5), a defect that may predispose them to accelerated atherosclerosis, as described for non-uremic patients with decreased endothelial-mediated vasodilation and coronary artery disease (6). Renal replacement therapy by kidney transplantation improves endothelial function (7), but results obtained after hemodialysis are controversial, some showing improvement (4,8,9); and others not (10,11) and yet another one showing increased endothelial dysfunction after a single session of hemodialysis (12).

Patients with ESRD have increased levels of oxidative stress markers and impaired endothelial cell function (14). Both reduced antioxidant systems and increased pro-oxidant activity generate the increased oxidative stress observed in ESRD patients (1). Even a single hemodialysis session can increase plasma levels of oxidized LDL (12) and decrease total antioxidant capacity (15). Thus, hemodialysis would indeed induce oxidative stress and impair the bioactivity of nitric oxide (NO). However, several previous studies have demonstrated that endogenous inhibitors of nitric oxide synthase accumulate in ESRD and are cleared by dialysis (8,16). Therefore, hemodialysis would be beneficial to endothelial function

considering its properties in clearing dialysable endothelial toxins, but its known effect of causing high levels of oxidative stress could prevent that effect.

All but one study cited above evaluated arterial endothelial function. The capacitance vessels are utterly important in circulatory homeostasis. Indeed, arteries and veins have different biological activities concerning the endothelium, probably by marked regional and segmental heterogeneity in vascular endothelial function (17). During hemodialysis a large amount of fluids is removed from the body, thus the capacitance venous system would be more influenced than the arterial one in this situation. The aim of this study was to investigate endothelium-dependent and -independent venous function using the dorsal hand vein technique and oxidative stress before and after a single hemodialysis session in patients with ESRD.

### **Material and Methods**

This study was performed on 9 patients (6 women and 3 men) with established ESRD, who had been maintained on renal replacement therapy with hemodialysis for at least three months at the Nephrology Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Hemodialysis was performed three times a week, ~4 h/session. All patients were receiving recombinant human erythropoietin (3.000 – 6.000 U/week) for at least three months. Four patients were taking angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, two patients were taking ACE inhibitors plus diuretics, two patients were taking ACE inhibitors plus calcium channel blockers, and one patient was taking an ACE inhibitor plus an antiplatelet agent. The patients were not given nitrates or alpha-receptor antagonists. The medications were discontinued 12 hours before the evaluation. During the period of the study all patients continued the usual dialysis prescribed using Fresenius Medical Care 4008 B dialysis machines with polysulfone membranes (Fresenius Medical Care, GE). All patients were dialysed against bicarbonate. Ten age- and sex-matched healthy control subjects (6 women, 4 men) not using any

medication were also recruited. The study was previously approved by the local research Ethics Committee (process 02-413/2002) and all subjects provided written informed consent.

Exclusion criteria included diabetes, age > 60 years, smoking, obesity (body mass index > 30 kg/m<sup>2</sup>) and patients who had hypotensive episodes during hemodialysis (more than 20 mmHg mean arterial pressure reduction). No patient had symptomatic coronary artery disease or cerebrovascular disease. The etiology of ESRD was as follows: systemic arterial hypertension (n=2), polycystic kidney disease (n=2), reflux nephropathy (n=2), focal segmental glomerulosclerosis (n=1), Henoch-Shoenlein purpura (n=1) and unknown (n=1). All subjects avoided caffeine and alcohol-containing drinks on the day of the study and were fasted for at least four hours before each evaluation. They were given heparin at a bolus dose of 5000 U at the initiation of dialysis, followed by 1000 U/h.

### **Dorsal hand vein technique**

Venous endothelial function was assessed in all patients and controls with the dorsal hand vein technique. Endothelial function measurements were done immediately before and after hemodialysis with the same hand vein on the non-fistula arm or the non-dominant arm in controls. The dorsal hand vein technique used was previously described by Aellig, 1981(18), and our group has been using this technique (19). Briefly, a 23-gauge butterfly needle was inserted into a suitable vein on the back of the hand with the arm positioned at an upward angle of 30 degrees and a continuous infusion of physiologic saline solution (0.3 mL/min) was started. A tripod holding a linear variable differential transformer (LVDT; Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ) was mounted on the hand with the central aperture of the LVDT that contained a movable metallic core at a distance of 10 mm downstream from the tip of the needle. The signal output of the LVDT, which is linearly proportional to the vertical movement of the core, provided a measurement of the vein diameter. Readings are taken at a congestive pressure of 40 mmHg by inflating a blood pressure cuff placed on the upper

portion of the arm being studied. Results are presented as normalized dose-response curves in which the diameter of the vein during saline infusion with the cuff inflated was defined as 100% relaxation.

The vein was precontracted by infusing increasing doses of the  $\alpha$ 1-adrenergic selective agonist phenylephrine (phenyl; 25 to 8333.3 ng/min) until the dose that produced approximately 70% constriction of the vein was found ( $ED_{70}$ ). This degree of precontraction was defined as 0% venodilation. The endothelium-dependent venodilation was assessed with incremental infusions of acetylcholine (Ach; 3.6, 36, 360, 720, 1800 ng/min), and endothelium-independent venodilation with sodium nitroprusside (SNP; 495.3 and 990.6 ng/min), has been calculated as a percentage of the range between 100% and 0% vasodilation. Drugs were infused with a Harvard infusion pump (Harvard Apparatus Inc., South Natick, Mass). Blood pressure and heart rate were monitored in the right leg with a sphygmomanometer. Ambient temperature was kept constant between 21 and 24°C.

### **Oxidative stress**

Oxidative stress was measured in the ESRD patients and evaluated by measuring oxidative damage (protein oxidation) and antioxidant defense (total radical trapping antioxidant potential - TRAP). Blood samples were obtained pre and post-hemodialysis, centrifuged for 10 min at 1000 g (Sorval RC 5b-rotor SM 24, Du Pont Instruments, Norwalk, Connecticut), and plasma was separated.

Plasma samples were used to determine protein oxidation by means of carbonyl group measurements and were incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH 10 mmol/L) in a 2.5 mol/L HCl solution for 1h at ambient temperature, in the dark. Samples were vortexed every 15 min. Then 20% TCA (w/v) solution was added in tube samples, left in ice for 10 min and centrifuged for 5 min at 1000 g, to collect protein precipitates. Another wash was performed with 10% TCA. The pellet was washed 3 times with ethanol: ethyl acetate (1:1)

(v/v). The final precipitates were dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride solution, left for 10 min at 37°C, and read at 360 nm (20). The results were expressed as nmol/mg prot.

TRAP, which indicates plasma total antioxidant capacity, was measured by luminescence using 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane; ABAP, a source of alkyl peroxy free radicals) and luminol. A calibration curve was obtained by using 0.2 to 1  $\mu$ M Trolox. The addition of plasma samples instead of Trolox elicits an induction time related to the initial amount of sample added (21). Luminescence was measured with a scintillation counter in the out-of-coincidence mode and the results are reported as mmol Trolox L<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

### **Biochemical measurements**

Blood samples were taken before and after dialysis for analysis of hematocrit, total cholesterol, triglycerides and plasma glucose. Total cholesterol, triglycerides and plasma glucose were determined by automated enzymatic commercial kits (Roche, Mannheim, GE).

### **Statistical analysis**

Analyses were performed using SPSS<sup>®</sup> Base 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results are given as mean  $\pm$  SEM. Variables that did not have a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were log-transformed before further analyses ( $\log_{10}$ ). Differences were analyzed using Student's paired or unpaired *t*-test as appropriate. The dose-percentage venodilation maximum response curves in each acetylcholine dose were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. The magnitude of change ( $\Delta$ ) in the endothelium-dependent venodilation, TRAP and carbonyls was calculated as the difference between pre- and post-HD. The association between endothelial venous function and oxidative stress was calculated using Pearson's correlation. The differences were recognized as statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

Table 1 shows the clinical and laboratory characteristics of the patients and controls studied. No differences were observed between the control group and patients with ESRD concerning age ( $36.8 \pm 3.0$  vs  $38.2 \pm 4.0$  years;  $P = 0.777$ ) and body mass index ( $23.4 \pm 0.7$  vs  $22.7 \pm 1.0$  kg/m<sup>2</sup>;  $P = 0.585$ ). There were significant differences in hematocrit between pre-hemodialysis (pre-HD) and controls ( $P < 0.001$ ), pre-HD vs post-HD period ( $P = 0.012$ ), and in body weight from pre-HD to post-HD evaluation ( $P < 0.001$ ). There were no differences between controls vs pre-HD and between pre-HD vs post-HD concerning total cholesterol, triglycerides, plasma glucose, systolic arterial pressure, diastolic arterial pressure and mean arterial pressure. The mean time from the beginning of hemodialysis was  $55.0 \pm 16.6$  months.

Endothelial venous function data is shown in Table 2. Maximum venodilation by acetylcholine was significantly improved after a single hemodialysis session ( $P = 0.045$ ). As compared with controls, endothelium-dependent venodilation was significantly lower in pre-HD patients ( $P = 0.010$ ). Dilation in response to SNP (endothelium-independent venodilation) was similar before and after HD ( $P = 0.671$ ), or when compared to controls subjects ( $P = 0.890$ ). Figure 1 depicts the dose-response curve, i.e., the maximum venodilation response at the 5 acetylcholine doses used. There were no differences among doses (3.6, 36, 360, 720 and 1800 ng/min) within the pre-HD and post-HD groups ( $P = 0.359$ ). There was a rise in this response induced by hemodialysis ( $P < 0.001$ ).

The dose of phenylephrine to reach ED<sub>70</sub> and doses of acetylcholine and sodium nitroprusside needed to reach maximum venodilation were not different between controls and pre-HD patients and between the evaluation performed before vs after hemodialysis (Table 2). There were no significant differences in the diameter of baseline venodilation between controls ( $1.0 \pm 0.1$  mm) and pre-HD patients ( $0.9 \pm 0.1$  mm;  $P = 0.632$ ) and in patients before HD ( $0.9 \pm 0.1$  mm) vs after the period ( $1.1 \pm 0.2$  mm;  $P = 0.324$ ).

Concerning oxidative stress, no protein oxidative damage was observed ( $P = 0.389$ ) comparing the evaluation performed before HD ( $15.8 \pm 0.6$  nmol/mg protein) *vs* after HD ( $16.6 \pm 0.6$  nmol/mg protein). However, there was a significant reduction ( $P = 0.001$ ) of the total antioxidant capacity (TRAP) comparing the evaluation performed before HD ( $402.0 \pm 53.5$  U of Trolox/ $\mu$ L plasma) *vs* after HD ( $157.1 \pm 28.3$  U of Trolox/ $\mu$ L plasma).

There was a negative correlation between  $\Delta$  of the endothelium-dependent venodilation and  $\Delta$  of TRAP (Figure 2). However, no correlation was established between  $\Delta$  of endothelium-dependent venodilation and  $\Delta$  of carbonyls ( $r = -0.53$ ;  $P = 0.146$ ).

## **Discussion**

This study shows that endothelium-dependent venodilation was impaired in patients with ESRD and a single hemodialysis session can improve it significantly, in association with reduced plasma total antioxidant capacity and unmodified protein damage. Moreover, endothelium-dependent venodilation was negatively associated with plasma total antioxidant capacity.

Several studies (3-5) suggest that endothelial dysfunction is present in patients with ESRD submitted to maintenance hemodialysis. However, only the present study and the one reported by Hand et al in 1998 evaluated the endothelial venous function (4). Our data is in accordance with theirs in showing the presence of endothelial venous dysfunction - that is improved after a single hemodialysis session - and no impairment of endothelium-independent vasodilation. The present study also shows that endothelial venous function is improved after a single hemodialysis session. The amelioration of endothelial function has already been reported by others in the arterial bed (8,9) and in the venous bed (4). However, in our study endothelial function was measured immediately before and immediately after hemodialysis, while in the study of Hand et al (4) the pre-dialysis evaluation was performed  $> 24$  hours after the previous hemodialysis session and  $< 16$  hours before the next one.

In other studies (8,9), endothelial function was evaluated using vascular ultrasound to measure flow-mediated dilatation of the brachial artery and forearm strain-gauge plethysmography, whereas we performed the endothelial evaluation using a pharmacological stimulus (acetylcholine). We measured the vasodilation in the venous vascular bed, which seems to be advantageous, considering the close relationship between venous capacitance bed and hemodialysis-induced changes. Also, arterial wall changes induced by hypertension and atherosclerosis, both very common in these patients, could determine unexpected vasodilatory responses not actually representing endothelial dysfunction.

Our data, however, are different from those of Myiazaki et al (12), that suggested that hemodialysis *per se* impairs endothelial function. We think that the venous bed is a more sensitive target of changes, so we could detect the amelioration induced by the hemodialysis session because the dorsal hand vein is more sensitive to detect this improvement in this setting, as compared to flow-mediated vasodilation during reactive hyperemia using high-resolution ultrasound doppler echocardiography. Even though we excluded patients who presented hypotension during the hemodialysis session, weight reduction was observed, because fluid was effectively removed by the procedure. This fact could be responsible for improved venous compliance and consequently, better endothelium-dependent venodilation after the hemodialysis session.

Endothelial venous function amelioration could be explained by other factors not studied by us. Asymmetric dimethylarginine (ADMA, an endogenous inhibitor of NO synthase), total plasma homocysteine (tHcy; which directly damages the endothelium and may inactivate NO) and ADMA/L-arginine ratio fell significantly after hemodialysis, but there was no correlation between the plasma concentrations of these substances and flow-mediated dilation (FMD) (8). Circulating ADMA was reported to be a strong predictor of cardiovascular mortality in patients with ESRD (22). However, another study showed that

ADMA and symmetric dimethylarginine were poorly eliminated during hemodialysis. This is probably due to a high level of binding of both molecules to plasma proteins (23). Be as it may, the concentrations of both dimethylarginines are increased in patients with ESRD and may explain at least in part endothelial dysfunction in this patient population.

Our results also present a reduction of antioxidant capacity (TRAP) induced by hemodialysis, which was not accompanied by protein oxidative damage. We did not evaluate other markers of oxidative damage and antioxidant defense, therefore we could not effectively prove that oxidative stress did not occur. However, increased endothelium-dependent vasodilation and reduced TRAP occurred after hemodialysis and were negatively correlated, as evaluated by the magnitude of change of both variables. These changes might mean that antioxidant defenses are effectively related to endothelial venous function amelioration induced by dialysis, because patients with major improvement in endothelial function presented the lower TRAP reduction. Oxidative stress was measured through a very sensitive method that involves chemiluminescence, allowing high precision determinations with small amounts of sample (24). The TRAP technique measures the antioxidant capacity of plasma, which is a combination of the effect of all of the chainbreaking antioxidants, including thiol groups (especially glutathione), uric acid and ascorbic acid (25). One limitation of our study was not to measure systemic inflammatory mediators that could be related to chronic renal failure itself and also to the HD session, since changes in these mediators could partially explain the endothelial function improvement.

Our results are different from those of Miyazaki et al (12), who demonstrated that hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress, but their results could be related to the different plasma markers they used (oxidative damage and TRAP vs oxidized LDL). However, endothelial dysfunction is not related to LDL oxidation, suggesting that LDL oxidation might not be a major cause of vascular endothelial dysfunction in ESRD (26).

Considering the present data, antioxidant treatments could be useful to improve the endothelial venous function of patients submitted to HD. Previous studies showed that vitamin E-coated dialyzer may decrease oxidative stress through local mechanisms (12, 27), and oral vitamin E can reduce cardiovascular events in patients on hemodialysis (28). These studies further support the role of oxidative stress and its treatment in the development and prevention of cardiovascular complications in these patients.

It is well-known that endothelium-dependent vasodilation is positively correlated with total antioxidative activity, reduced glutathione (GSH), and lag phase of LDL and negatively correlated with oxidized GSH (GSSG), GSSG/GSH and diene conjugates, showing that an impaired endothelium vasodilation function and oxidative stress are related to each other in patients with ESRD (14). A recent study showed that FMD, oxidative stress, and ADMA levels all are associated with the stage of ESRD. Additionally, levels of oxidative stress markers and ADMA independently determine endothelial function (29).

The present findings allow us to conclude that a single session of hemodialysis improved endothelial venous function and that antioxidant potential might be associated with this improvement in patients with ESRD. The evaluation of venous and arterial endothelial function in the same patients, before and after a hemodialysis session, can promote better understanding of the discrepancy of responses observed between the different vascular beds. Just as patients with ESRD present endothelial dysfunction for multifactorial reasons, changes in endothelial function resulting from a hemodialysis session must also be attributed to a combination of factors that has not yet been fully established.

## **References**

1. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272-1280.

2. Zoccali C. Cardiovascular risk in uraemic patients—is it fully explained by classical risk factors? *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 454-457.
3. van Guldener C, Lambert J, Jansen MJ, Steyn M, Donker AJ, Stehouver CD. Endothelium dependent vasodilatation and distensibility of large arteries in chronic hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: S14-18.
4. Hand MF, Haynes WG, Webb DJ. Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int* 1998; 53: 1068-1077.
5. Nakanishi T, Ishigami Y, Otaki Y, Izumi M, Hiraoka H, Inoue T, et al. Impairment of vascular responses to reactive hyperemia and nitric oxide in chronic renal failure. *Nephron* 2002; 92: 529-535.
6. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678.
7. Passauer J, Bussemaker E, Lässig G, Gross P. Kidney transplantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with end-stage renal disease. *Transplantation* 2003; 75: 1907-1910.
8. Cross J M, Donald A, Vallance PJ, Deanfield JE, Woolfson RG, Macallister RJ. Dialysis improves endothelial function in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1823-1829.
9. McGregor DO, Buttimore AL, Lynn KL, Yandle T, Nicholls MG. Effects of long and short hemodialysis on endothelial function: a short-term study. *Kidney Int* 2003; 63: 709-715.
10. Migliacci R, Falcinelli F, Imperiali P, Floridi A, Nenci GG, Gresele P. Endothelial dysfunction in patients with kidney failure and vascular risk factors: acute effects of hemodialysis. *Ital Heart J* 2004; 5: 371-377.

11. Kosch M, Levers A, Barenbrock M, Matzkies F, Schaefer RM, Kisters K, et al. Acute effects of haemodialysis on endothelial function and large artery elasticity. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1663-1668.
12. Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin e-coated dialyzer. *Circulation* 2000; 101: 1002-1006.
13. Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS, Jardine AG. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1194-1200.
14. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2747-2752.
15. Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem* 1995; 41: 1135-1138.
16. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575.
17. Sousa MG, Yugar-Toledo JC, Rubira M, Ferreira-Melo SE, Plentz R, Barbieri D, et al. Ascorbic acid improves impaired venous and arterial endothelium-dependent dilation in smokers. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 447-452.
18. Aellig WH. A new technique for recording compliance of human hand veins. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11: 237-243.
19. Signori LU, Silva AMV, Plentz RDM, Geloneze B, Moreno Júnior H, Belló-Klein A, et al. Reduced venous endothelial responsiveness after oral lipid overload in healthy volunteers. *Metabolism* 2008; 57: 103-109.
20. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.

21. Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 299-311.
22. Zoccali C, Bode-Böger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2113-2117.
23. Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 23-28.
24. Gutierrez LLP, Mazzotti NG, Araújo ASR, Klipel RB, Fernandes TRG, Llesuy SF, et al. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 767-772.
25. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106-1114.
26. Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, et al. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1189-1197.
27. Galli F, Rovidati S, Chiarantini L, Campus G, Canestrari F, Buoncristiani U. Bioreactivity and biocompatibility of a vitamin E-modified multi-layer hemodialysis filter. *Kidney Int* 1998; 54: 580-589.
28. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356: 1213-1218.
29. Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K, Cakir E, Sonmez A, Ozgurtas T, et al. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 42-50.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of controls and ESRD patients before (pre-HD) and after hemodialysis (post-HD).

Parameter	Control (n=10)	Pre-HD (n=9)	Post-HD (n=9)
Hematocrit (%)	41.8 ± 1.3	31.6 ± 1.6 *	35.5 ± 1.9 <sup>+</sup>
Total cholesterol (mg/dL)	181.9 ± 8.9	160.3 ± 12.8	161.6 ± 13.0
Triglycerides (mg/dL)	66.8 ± 5.9	78.1 ± 7.5	78.8 ± 5.6
Plasma glucose (mg/dL)	87.6 ± 1.8	90.5 ± 1.3	92.4 ± 2.4
Body weight (kg)	66.1 ± 3.4	60.2 ± 4.0	57.6 ± 3.9 <sup>+</sup>
SAP (mmHg)	118.0 ± 3.4	133.8 ± 6.8	127.5 ± 4.1
DAP (mmHg)	74.3 ± 2.6	80.0 ± 5.0	80.0 ± 3.3
MAP (mmHg)	88.9 ± 2.8	97.9 ± 5.0	95.8 ± 3.0

Values are expressed as mean ± SEM; HD: hemodialysis; SAP: systolic arterial pressure; DAP: diastolic arterial pressure. MAP: mean arterial pressure. \*P < 0.05 vs controls (Student's unpaired *t*-test); <sup>+</sup>P < 0.05 vs pre-HD (Student's paired *t*-test).

Table 2. Endothelial venous function of controls and ESRD patients before (pre-HD) and after hemodialysis (post-HD).

Response	Control	Pre-HD	Post-HD
Venoconstriction (% phenyl)	77.0 ± 2.9	78.8 ± 3.9	78.1 ± 4.2
E <sub>max</sub> (% acetylcholine)	109.6 ± 10.8	65.6 ± 10.5*	106.6 ± 15.7 <sup>+</sup>
E <sub>max</sub> (% SNP)	147.7 ± 13.1	150.3 ± 13.7	157.2 ± 16.3
Drug concentrations			
ED <sub>70</sub> (ng/min phenyl)	38.9 ± 10.1	61.1 ± 20.8	65.3 ± 21.6
E <sub>max</sub> (ng/min acetylcholine)	964.0 ± 222.4	892.0 ± 290.2	865.1 ± 277.9
E <sub>max</sub> (ng/min SNP)	594.4 ± 66.0	550.3 ± 55.0	605.4 ± 72.8

Data are mean ± SEM. HD: hemodialysis; phenyl: phenylephrine; E<sub>max</sub>: maximum effect; SNP: sodium nitroprusside; ED<sub>70</sub>: dose that produced approximately 70% constriction of the vein. \*P < 0.05 vs controls (Student's unpaired *t*-test); <sup>+</sup>P < 0.05 vs pre-HD (Student's paired *t*-test). Values of drug concentrations before log transformation (log<sub>10</sub>).

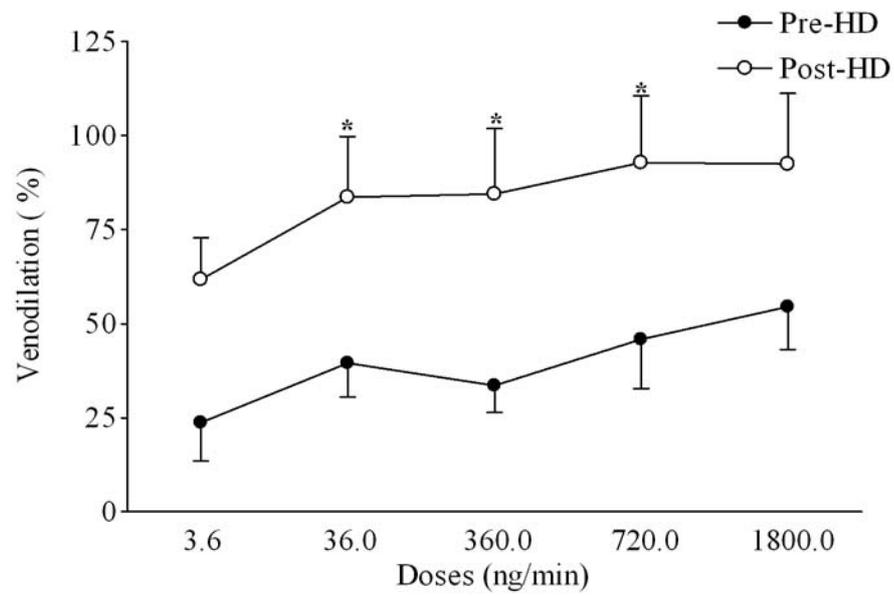


Figure 1. Data on the evaluation of endothelium venous function showing the average maximal percentage venodilation *vs* acetylcholine doses. Two-way repeated measures ANOVA was used for all comparisons between before (pre-HD) and after hemodialysis (post-HD) (interaction:  $P = 0.973$ ; groups:  $P = 0.359$ ; doses:  $P < 0.001$ ); (\*)  $P < 0.05$  *vs* pre-HD by the Bonferroni post hoc test.

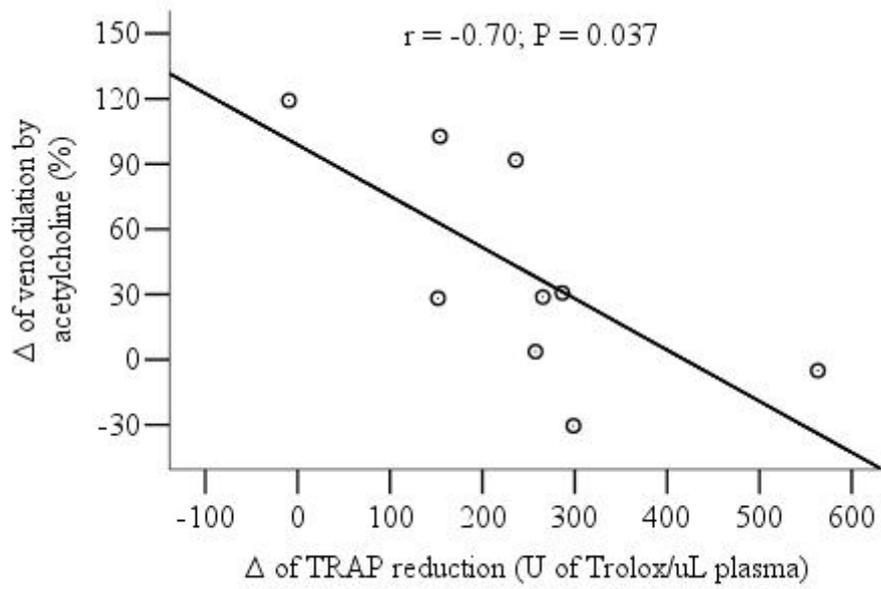


Figure 2. Scattergram plotting  $\Delta$  of TRAP (delta of plasma total antioxidant capacity) reduction and  $\Delta$  of venodilation induced by acetylcholine during the endothelium venous function evaluations.

## **4.2 Estudo 2: Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes.**

Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes

Endothelial function and microalbuminuria

Antônio M. V. Silva<sup>1,2</sup>, MSC; Beatriz D. Schaan, PHD<sup>3,4</sup>, Luis U. Signori, PHD<sup>3</sup>; Rodrigo D.M. Plentz, PHD<sup>3</sup>; Heitor Moreno Jr, PHD<sup>5</sup>, Marcello C. Bertoluci<sup>6</sup>, PHD; Maria C. Irigoyen, PHD<sup>1,7</sup>.

<sup>1</sup>Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>2</sup>Department of Physiotherapy, University of Santa Cruz do Sul, Brazil; <sup>3</sup>Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul/University Foundation of Cardiology, Brazil; <sup>4</sup>Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>5</sup>Department of Pharmacology, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; <sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>7</sup>Hypertension Unit, InCor, Clinical Hospital of São Paulo, São Paulo University Medical School, Brazil.

Corresponding author: Beatriz D. Schaan. Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Unidade de Pesquisa. Avenida Princesa Isabel, 370. Santana. 90620-001. Porto Alegre, RS, Brasil. Telephone: 51-3223-2746. Fax: +55-51-3219-2802 Ext 21/24. E-mail: beatrizschaan@gmail.com

Word count: 3014

Number of tables and figures: 3

**OBJECTIVE** - The aim of this study was to investigate the endothelial function in the venous and arterial bed in patients with type 2 diabetes with normoalbuminuria or microalbuminuria.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS** – We evaluated 28 patients with type 2 diabetes,  $HbA_{1c} < 7.5\%$ , who were classified as normo- (albuminuria  $< 30$  mg/24 h;  $n = 16$ ) or microalbuminuric (albuminuria 30-300 mg/24 h;  $n = 12$ ). Venous and arterial endothelial function were assessed by the dorsal hand vein technique (venodilation by acetylcholine) and brachial artery flow-mediated vasodilation, respectively.

**RESULTS** – Patients were normotensive (systolic arterial pressure:  $131.1 \pm 10.6$  mmHg) and on good metabolic control ( $HbA_{1c}$ :  $6.6 \pm 0.6$  %). Microalbuminuric patients presented impaired venous ( $32.9 \pm 17.4\%$  vs.  $59.3 \pm 26.5\%$ , respectively,  $P = 0.004$ ) and arterial vasodilation ( $1.8 \pm 0.9\%$  vs.  $5.1 \pm 2.4$ , respectively,  $P < 0.001$ ), as compared to normoalbuminuric patients. There was a negative correlation between acetylcholine-induced venodilation and albuminuria ( $r = -0.53$ ,  $P = 0.004$ ) and  $HbA_{1c}$  ( $r = -0.41$ ,  $P = 0.032$ ). The same was observed between flow-mediated arterial vasodilation and albuminuria ( $r = -0.49$ ,  $P = 0.007$ ) and  $HbA_{1c}$  ( $r = -0.44$ ,  $P = 0.019$ ). Venous and arterial vasodilation was positively correlated. ( $r = 0.50$ ,  $P = 0.007$ ).

**CONCLUSIONS** – Both venous and arterial endothelial function are impaired in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. The two methods used for endothelial function evaluation were positively correlated. Even though patients had good metabolic control as a group, vasodilation responses were negatively correlated with  $HbA_{1c}$ .

Diabetes mellitus is associated with an increased incidence of atherosclerosis and consequently cardiovascular events. Prospective studies have found that microalbuminuria is predictive of diabetic nephropathy in type 2 diabetes and all-cause cardiovascular mortality in subjects with (1) or without diabetes (2). The high incidence of cardiovascular mortality in type 2 diabetes with microalbuminuria cannot be fully explained by the presence of conventional cardiovascular risk factors. The pathophysiologic mechanisms underlying the association between microalbuminuria and cardiovascular disease is not fully defined. Microalbuminuria reflects subclinical vascular damage in the kidneys, but it may also signify systemic endothelial dysfunction that itself predisposes to cardiovascular events (3).

Endothelial dysfunction is associated with the classical cardiovascular risk factors and with the development of atherosclerosis. Diabetes mellitus (4,5) and hyperglycemia *per se* (6) impair the endothelium vasodilating properties, leading to endothelial dysfunction. Moreover, recent studies demonstrated increased endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria as compared to normoalbuminuric patients (7,8). However, there is no information about endothelial function of the venous vascular bed in these patients, even knowing that the confounding effects associated with arterial vascular hypertrophy and other structural changes may be avoided when studying veins (9). Indeed, it is not yet known whether venous endothelial function is impaired in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria as compared to normoalbuminuric patients. Further, it has not been clearly demonstrated whether arterial and venous endothelium are both impaired in the same patients.

The aim of this study was to investigate the endothelial function in the arterial and venous bed in patients with type 2 diabetes and to compare the vasodilation responses between patients with normoalbuminuria and microalbuminuria.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

Twenty-eight patients with type 2 diabetes, 40-70 years old were recruited from the Department of Internal Medicine at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Medical history, physical examination and laboratory evaluation were performed for each subject. They were classified according to their urinary albumin excretion rate (UAE) as normoalbuminuric ( $n = 16$ ,  $\text{UAE} < 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$ ; 8 men) and microalbuminuric ( $n = 12$ ,  $\text{UAE} < 300 \text{ mg}/24 \text{ h}$ , but  $\geq 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$ ; 8 men). UAE was expressed as the mean of two 24 h urine collections, taken within a 6-month period. Type 2 diabetes was defined as the onset of diabetes after the age of 40 years, initially treated by diet and/or oral anti-diabetic medication. The study was previously approved by the local research Ethics Committee and all subjects provided written informed consent. The investigations conformed with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Exclusion criteria were:  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg}/\text{m}^2$ , glycated hemoglobin ( $\text{HbA}_{1c}$ )  $> 7.5 \%$ , creatinine  $> 1.2 \text{ mg}/\text{dl}$ , systolic arterial pressure  $> 160 \text{ mmHg}$ , diastolic arterial pressure  $> 90 \text{ mmHg}$ , drugs that could interfere with endothelial function evaluation (steroids or estrogen replacement, insulin, alpha receptor antagonists or nitrates), retinopathy, clinical evidence of neuropathy, coronary or cerebrovascular disease. All subjects were non-smokers and were instructed to avoid caffeine-containing drinks or alcohol for the 12 h period preceding the studies. The studies started about 3 h after a light breakfast. Both venous and arterial endothelial function evaluations were performed on the same day, following always the same sequence of venous before arterial evaluation.

### Dorsal hand vein technique

Endothelial function evaluation was performed in a quiet room at a constant temperature of  $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Venous endothelial function was assessed in all patients with the dorsal hand vein technique. This method was previously described by Aellig (10), and our group has been

using this technique (11). Briefly, a 23-gauge butterfly needle was inserted into a suitable vein on the back of the hand and a continuous infusion of physiologic saline solution (0.3 mL/min) was started. A tripod holding a linear variable differential transformer (LVDT; Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ) was mounted on the hand with the central aperture of the LVDT that contained a movable metallic core at a distance of 10 mm downstream from the tip of the needle. The signal output of the LVDT, which is linearly proportional to the vertical movement of the core, provided a measurement of the vein diameter. Readings are taken at a congestive pressure of 40 mmHg by inflating a blood pressure cuff placed on the upper portion of the arm being studied. The vein was precontracted by infusing increasing doses of the  $\alpha$ 1-adrenergic selective agonist phenylephrine (25 to 8333.3 ng/min) until the dose that produced approximately 70% constriction of the vein was found ( $ED_{70}$ ). This degree of precontraction was defined as 0% venodilation. The endothelium-dependent venodilation was assessed with incremental infusions of acetylcholine (3.6 to 3600 ng/min), and endothelium-independent venodilation with sodium nitroprusside (495.3 to 990.6 ng/min) has been calculated as a percentage of the range between 100% and 0% vasodilation. Drugs were infused with a Harvard infusion pump (Harvard Apparatus Inc., South Natick, Mass). Blood pressure and heart rate were monitored in the contralateral arm with a sphygmomanometer.

### **Ultrasound of the brachial artery**

Flow-mediated vasodilation (FMD) was measured according to recent guidelines (12) to evaluate endothelium-dependent vasodilation using high-resolution vascular ultrasound (EnVisor CHD, Philips, Bothell, WA, USA) and a 3-12 MHz linear-array transducer (L12-3, Philips, Bothell, WA, USA). FMD was assessed by measuring the change in brachial artery diameter after 60 s of reactive hyperemia compared with a baseline measurement after deflation of a cuff that had been placed around the forearm and that had been inflated to 50 mmHg above systolic blood pressure for 5 min. The diameter increase after sublingual

nitroglycerin (NTG) spray (0.4 mg) was used as a measure of endothelium-independent vasodilation. The vessel diameter responses to reactive hyperemia and to nitroglycerin were expressed as the percent changes relative to the diameter immediately before cuff inflation and to the diameter immediately before drug administration, respectively. A midartery pulsed Doppler signal was obtained to evaluate basal flow and upon immediate cuff release, and no later than 15 s after cuff deflation to assess hyperemic flow.

### **Biochemical measurements**

Venous blood and urine samples were obtained during the morning hours after an overnight fast. UAE was determined by immunoturbidimetry (MicroAlb; Ames-Bayer, Tarrytown, NY, USA). Von Willebrand factor (vWf) was measured in duplicate samples using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Asserachrom vWf; Diagnostica Stago, France), plasma glucose by the glucose-peroxidase colorimetric enzymatic method (Biodiagnóstica, Pinhais, Brasil), total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides by a colorimetric method and HbA<sub>1c</sub> by a high-performance liquid chromatography system (Merck-Hitachi L-9100; Merck, Darmstadt, Germany). LDL cholesterol was calculated according to the Friedwald formula. Serum and urinary creatinine were measured by the Jaffé method. Serum insulin was determined by enzyme immunoassay commercial kits (Abbot-Murex, Park, IL, USA,) and high-sensitivity C-reactive protein (CRP) by nephelometry.

### **Statistical analyses**

Analyses were performed using SPSS<sup>®</sup> Base 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Variables that did not have a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test) were log-transformed before further analyses ( $\log_{10}$ ). Differences between the groups were tested with an unpaired Student's *t* test. The associations were calculated using Pearson's correlation. The differences were recognized as statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

No differences were observed between normo- and microalbuminuric groups concerning age ( $59.6 \pm 4.8$  vs.  $57.2 \pm 5.1$  years;  $P = 0.219$ ), BMI ( $26.8 \pm 1.9$  vs.  $26.6 \pm 4.2$  kg/m<sup>2</sup>;  $P = 0.877$ ) and duration of diabetes ( $5.4 \pm 2.3$  vs.  $6.1 \pm 3.0$  years;  $P = 0.539$ ). A similar percentage ( $P > 0.05$  in all comparisons) of patients in the normo- and microalbuminuric groups were on angiotensin converting-enzyme inhibitors (75% and 83%), glibenclamide (38% and 42%), metformin (69% and 83%), statins (44% and 50%), diuretics (56% and 50%) and AAS (63 % and 67%). Baseline clinical and laboratory data are presented in Table 1. There were no differences between the groups concerning these characteristics, except for UAE, which was higher in the microalbuminuric group, as expected. Patients with microalbuminuria tended to have a higher vWf as compared with those with normoalbuminuria.

Venous and arterial endothelial function data are shown in Table 2. Endothelium-dependent venodilation, as measured for maximum venodilation by acetylcholine, was significantly decreased in the microalbuminuric group, as compared to normoalbuminuric patients. The vasoconstriction induced by phenylephrine and venodilation by sodium nitroprusside (endothelium-independent venodilation) were similar between groups. The dose of phenylephrine to reach ED<sub>70</sub> and doses of acetylcholine and sodium nitroprusside needed to reach maximum venodilation were not different between normo- and microalbuminuric groups. The diameter of the dorsal hand vein did not differ between normo- ( $1.2 \pm 0.7$  mm) and microalbuminuric ( $1.1 \pm 0.4$  mm) groups ( $P = 0.515$ ). The brachial artery FMD was decreased in the microalbuminuric group, but the hyperemic flow and NTG-induced vasodilation were not different between the groups. There was no difference in baseline brachial artery diameter ( $3.6 \pm 0.6$  vs.  $3.9 \pm 0.7$  mm;  $P = 0.195$ ) and basal flow ( $136.8 \pm 24.3$  vs.  $139.8 \pm 25.8$  ml/min;  $P = 0.763$ ) in normo- vs. microalbuminuric patients.

The endothelium-dependent venodilation, as expressed by the percentage of venodilation by acetylcholine, was inversely correlated with UAE and HbA<sub>1c</sub> (Figure 1, Panels A and B), whereas it was positively correlated with FMD (Figure 1, Panel C). Moreover, FMD was inversely correlated with UAE ( $r = -0.49$ ;  $P = 0.007$ ) and HbA<sub>1c</sub> ( $r = -0.44$ ;  $P = 0.019$ ). Endothelium-dependent venodilation and FMD were not correlated with age, BMI, duration of diabetes, arterial pressure, lipid profile, plasma glucose, CRP, and vWf.

## CONCLUSIONS

This study shows, for the first time, that patients with well-controlled type 2 diabetes and microalbuminuria present impaired endothelium-dependent venodilation induced by acetylcholine, as compared to normoalbuminuric patients. Flow-mediated arterial vasodilation is also decreased in the microalbuminuric group. Interestingly, both venous and arterial endothelium-dependent vasodilation were negatively associated with UAE and HbA<sub>1c</sub> and were positively correlated with each other, suggesting a role for metabolic control in the impairment of both vascular functions.

In type 2 diabetes, increased urinary albumin excretion and endothelial dysfunction are interrelated processes that develop in parallel, progress with time, and are independently associated with risk of death (13). However, both disorders cannot be linked as a single one. It has become clear that the vascular endothelium is involved in the regulation of several processes, e.g. hemostasis, fibrinolysis, vasomotor control, vascular smooth-muscle growth, and vascular permeability, all of which may play a role in the pathogenesis of diabetic micro- and macroangiopathy (3).

Several studies have used FMD (4,7) or quantitative coronary angiography (8) to evaluate arterial endothelial function in patients with type 2 diabetes comparing normo- and microalbuminurics. In the present study, we show that patients with type 2 diabetes and microalbuminuria have impaired arterial endothelial function as compared to those with

normal albuminuria, despite similar endothelium-independent vasodilation, which is also in agreement with previous studies (4,8).

Although one study comparing patients with type 2 diabetes to control subjects showed impairment of venous endothelial function, whereas venoconstriction by  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation and venodilation by nitroglycerin were not altered (14), there are no studies comparing normo and microalbuminuric patients. Our group has already studied the venous endothelial function in healthy volunteers (11) and hypertensive patients (15). The present study shows that the vasodilatory response to acetylcholine is impaired in the venous vascular bed of microalbuminuric patients. However, phenylephrine-induced venoconstriction is preserved and there is also no change in endothelium-independent venodilation induced by sodium nitroprusside between the groups. These findings suggest that the vasoconstricting response to  $\alpha_1$ -adrenoreceptor stimulation is not greatly influenced by the presence of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes, or may be affected later in the course of diabetes. The impairment of muscarinic-receptor mediated venodilation in response to acetylcholine infusion is perhaps an earlier phenomenon involved in the pathogenesis of vasculopathy in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. Future prospective studies could display the potential role of this as an earlier marker of vascular dysfunction in diabetes.

We also measured plasma vWf, which is synthesized mainly by endothelial cells, and is commonly used as a surrogate marker for endothelial dysfunction (16). Our study is in accordance with the results of Yu et al. (4) showing that patients with microalbuminuria tended to have a higher vWf. However, recently published data could not even find a trend of higher vWf in microalbuminuric as compared to normoalbuminuric patients (17).

In order to avoid confounding factors we selected patients who were not using hormone replacement therapy, insulin therapy or smoking, which are possible determinants of

endothelial function changes. Patients with and without microalbuminuria were similar, especially in regard to sex ratio, age, body mass index, duration of diabetes, arterial pressure, lipid levels, glycemic control and treatment. Therefore, the more severe arterial and venous endothelial dysfunction in the patients with microalbuminuria cannot be explained by a different metabolic status.

An interesting finding of the present paper is that UAE is inversely correlated with the venous and arterial endothelium-dependent vasodilation. In children with type 1 diabetes a similar correlation was observed using the flow increase in reactive hyperemia as an endothelial function marker (5). However, other investigators reported only a weak association between UAE and endothelium-dependent vasodilation in the coronary arteries ( $r = -0.39$ ) in type 2 diabetes (8). The discrepancy on the magnitude of the correlation between studies with diabetes could be explained by different vascular beds assessed (venous and brachial artery vs. coronary artery) and different vasodilation stimulus (acetylcholine and FMD vs. cold pressor testing).

We also observed a negative correlation between HbA<sub>1c</sub> and the endothelium-dependent venodilation. As HbA<sub>1c</sub> represents glycemic control and patients with HbA<sub>1c</sub> > 7.5% were excluded from our study, the subjects enrolled in this experiment had good metabolic control. In another study, HbA<sub>1c</sub> was an independent predictor of endothelium-dependent vasodilation (7). Similar findings showed that endothelial function, evaluated in the skin microcirculation to iontophoresis of acetylcholine, was negatively correlated with HbA<sub>1c</sub>, suggesting that glycemic control may be an important factor in the regulation of endothelial function (18). Other investigators have reported that short-term improvement in glycemic control did not result in better endothelial function in type 2 diabetes (19). However, long-term insulin therapy (3.5 years) induced a sustained glycemic control improvement, determining better endothelial function (20). It is not clear whether glycemic instability may confer more risk for

diabetic complications than that predicted by mean glucose or HbA<sub>1c</sub> alone. It was recently suggested that individuals with larger glycemic excursions may develop diabetic complications more frequently than those with less glycemic excursions, even presenting similar HbA<sub>1c</sub> levels (21). The evaluation of glycemic variability could be used to identify the actual relationship between the metabolic control in diabetes and endothelial function. Also, a randomized clinical trial aiming to intensify glycemic control to HbA<sub>1c</sub> levels below 6.5% could result in improvement in the endothelial function not observed using the HbA<sub>1c</sub> criteria of < 7.5%.

Some authors suggested that the evaluation of endothelial function in different vascular beds (14) or using different vasodilatory stimuli (22) may provoke discrepancy in the vasodilatory responses. However, we demonstrated a positive association between venodilation by acetylcholine and brachial artery FMD, suggesting that similar vasodilatory responses may be observed in both peripheral veins and brachial artery. This finding can be explained because our patients present good metabolic and arterial pressure control and did not show any evidence of clinical atherosclerosis.

The findings of the present study in type 2 diabetes suggest that both vascular beds, arterial and venous, may be affected by the presence of microalbuminuria, even though these patients had good metabolic control. The vasodilation response in venous vascular bed in patients with type 2 diabetes needs further investigation.

### **Acknowledgments**

We would like to thank the Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and CAPES.

### **References**

1. Mogensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 310:356-360, 1984

2. Damsgaard EM, Froland A, Jorgensen OD, Mogensen CE: Microalbuminuria as predictor of increased mortality in elderly people. *BMJ* 300:297-300, 1990
3. Weir MR: Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2:581-590, 2007
4. Yu Y, Suo L, Yu H, Wang C, Tang H: Insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes patients with or without microalbuminuria. *Diabetes Res Clin Pract* 65:95-104, 2004
5. Ladeia AM, Ladeia-Frota C, Pinho L, Stefanelli E, Adan L: Endothelial dysfunction is correlated with microalbuminuria in children with short-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care* 28:2048-2050, 2005
6. Kocsis E, Pacher P, Pósa I, Nieszner E, Pogátsa G, Koltai MZ: Hyperglycaemia alters the endothelium-dependent relaxation of canine coronary arteries. *Acta Physiol Scand* 169:183-187, 2000
7. Papaioannou GI, Seip RL, Seip RL, Grey NJ, Katten D, Taylor A, Inzucchi SE, Young LH, Chyun DA, Davey JA, Wackers FJ, Iskandrian AE, Ratner RE, Robinson EC, Carolan S, Engel S, Heller GV: Brachial artery reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria (from the detection of ischemia in asymptomatic diabetics—brachial artery reactivity study). *Am J Cardiol* 94:294-299, 2004
8. Cosson E, Pham I, Valensi P, Paries J, Attali JR, Nitenberg A: Impaired coronary endothelium-dependent vasodilation is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes and angiographically normal coronary arteries. *Diabetes Care* 29:107-112, 2006
9. Cooper ME, Gilbert RE, Jerums G: Diabetic vascular complications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24:770-775, 1997
10. Aellig WH: A new technique for recording compliance of human hand veins. *Br J Clin Pharmacol* 11:237-243, 1981

11. Signori LU, Silva AMV, Plentz RDM, Geloneze B, Moreno Júnior H, Belló-Klein A, Irigoyen MC, D'Agord Schaan B: Reduced venous endothelial responsiveness after oral lipid overload in healthy volunteers. *Metabolism* 57:103-109, 2008
12. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R: 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* 39:257-265, 2002
13. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH: Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 51:1157-1165, 2002
14. Harada K, Ohmori M, Kitoh Y, Sugimoto K, Fujimura A: Impaired beta-adrenoceptor mediated venodilation in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol* 47:427-431, 1999
15. Rubira MC, Consolim-Colombo FM, Rabelo ER, Yugar-Toledo JC, Casarini D, Coimbra SR, Martins LC, Moreno HJr, Krieger EM, Irigoyen MC: Venous or arterial endothelium evaluation for early cardiovascular dysfunction in hypertensive patients? *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9:859-865, 2007
16. Vischer UM, Emeis JJ, Bilo HJ, Stehouwer CD, Thomsen C, Rasmussen O, Hermansen K, Wollheim CB, Ingerslev J: von Willebrand factor (vWf) as a plasma marker of endothelial activation in diabetes: improved reliability with parallel determination of the vWf propeptide (vWf: AgII). *Thromb Haemost* 80:1002-1007, 1998

17. Makino H, Doi K, Hiuge A, Nagumo A, Okada S, Miyamoto Y, Suzuki M, Yoshimasa Y: Impaired flow-mediated vasodilatation and insulin resistance in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes Res Clin Pract* 79:177-182, 2008
18. Cohen ND, Dunstan DW, Robinson C, Vulikh E, Zimmet PZ, Shaw JE: Improved endothelial function following a 14-month resistance exercise training program in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 79:405-411, 2008
19. Bagg W, Whalley GA, Gamble G, Drury PL, Sharpe N, Braatvedt GD: Effects of improved glycaemic control on endothelial function in patients with type 2 diabetes. *Intern Med J* 31:322-328, 2001
20. Vehkavaara S, Yki-Järvinen H: 3.5 years of insulin therapy with insulin glargine improves in vivo endothelial function in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:325-330, 2004
21. Hirsch IB, Brownlee M: Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control? *J Diabetes Complications* 19:178-181, 2005
22. Lüscher TF, Noll G: Endothelial function as an end-point in interventional trials: concepts, methods and current data. *J Hypertens Suppl* 14 (Suppl. 2):S111-S119, 1996

Table 1 – Baseline clinical and laboratory characteristics of the patients

Characteristic	Normoalbuminuric	Microalbuminuric	<i>P</i> value
	(n=16)	(n=12)	
Systolic BP (mmHg)	129.4 ± 11.8	133.3 ± 8.6	0.315
Diastolic BP (mmHg)	81.2 ± 5.3	83.8 ± 9.8	0.436
Plasma glucose (mmol/l)	6.9 ± 0.9	7.2 ± 1.5	0.523
HbA <sub>1c</sub> (%)	6.5 ± 0.6	6.7 ± 0.7	0.660
UAE (mg/24h) <sup>a</sup>	9.7 (3.0-17.3)	54.4 (37.5-74.2)	< 0.001
Creatinine (μmol/l)	80.1 ± 14.6	81.8 ± 12.6	0.750
Total cholesterol (mmol/l)	4.16 ± 0.81	4.39 ± 0.67	0.405
HDL cholesterol (mmol/l)	1.20 ± 0.23	1.18 ± 0.45	0.868
LDL cholesterol (mmol/l)	2.29 ± 0.74	2.48 ± 0.68	0.473
Triglycerides (mmol/l)	1.45 ± 0.41	1.59 ± 0.27	0.280
Insulinemia (pmol/l)	57.7 ± 25.7	63.7 ± 15.1	0.447
CRP (mg/l)	2.3 ± 0.8	2.2 ± 1.0	0.831
vWf (%)	132.2 ± 34.0	153.4 ± 26.4	0.074

Data are expressed as mean ± SD or <sup>a</sup> median (interquartile range); BP: blood pressure;

UAE: urinary albumin excretion; HbA<sub>1c</sub>: glycated hemoglobin; CRP: C-reactive protein;

vWf: von Willebrand factor. UAE values before log transformation (log<sub>10</sub>).

Table 2 – Venous and arterial endothelial function of the patients, according to their urinary albumin excretion levels

Parameter	Normoalbuminuric (n=16)	Microalbuminuric (n=12)	<i>P</i> value
Venoconstriction (% phenyl)	74.5 ± 8.3	71.7 ± 8.8	0.400
E <sub>max</sub> (% acetylcholine)	59.3 ± 26.5	32.9 ± 17.4	0.004
E <sub>max</sub> (% SNP)	113.7 ± 35.3	101.4 ± 28.4	0.319
Drug concentrations			
ED <sub>70</sub> (ng/min, phenylephrine) <sup>a</sup>	50 (25-100)	75 (31-100)	0.487
E <sub>max</sub> (ng/min, acetylcholine) <sup>a</sup>	3600 (450-3600)	2700 (720-3600)	0.737
E <sub>max</sub> (ng/min, SNP) <sup>a</sup>	495.3 (495.3-990.6)	495.3 (495.3-866.8)	0.727
Hyperemic flow (ml/min)	631.8 ± 57.8	643.1 ± 58.1	0.613
FMD (%)	5.1 ± 2.4	1.8 ± 0.9	< 0.001
NTG-induced vasodilation (%)	15.9 ± 5.6	14.2 ± 5.5	0.432

Data are expressed as mean ± SD; <sup>a</sup> data expressed as median and interquartile ranges. E<sub>max</sub>: maximum effect; SNP: sodium nitroprusside; ED70: dose that produced approximately 70% constriction of the vein. Values of drug concentrations before log transformation (log<sub>10</sub>). FMD: Flow-mediated vasodilation; NTG: nitroglycerin.

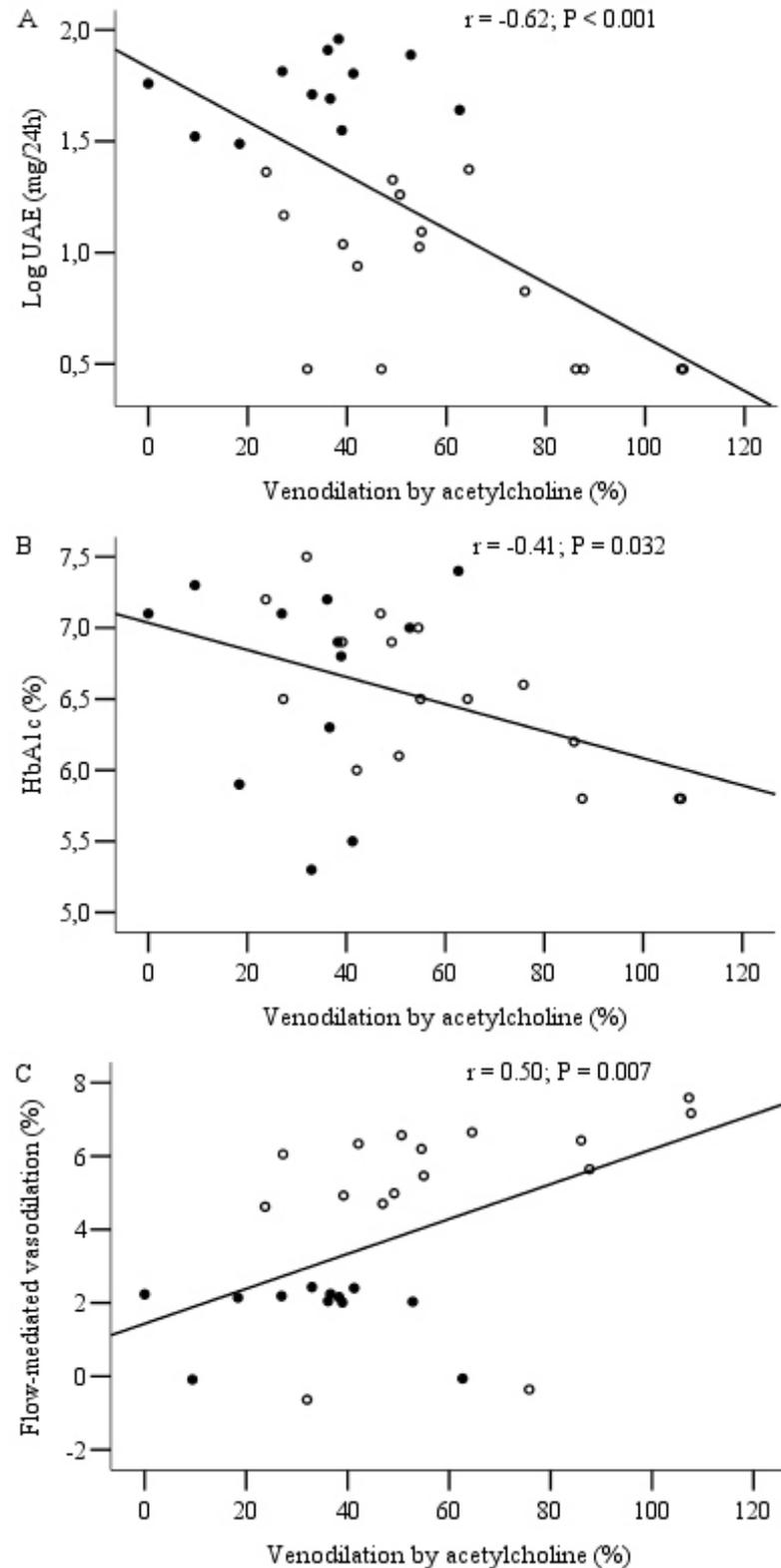


Figure 1 – Correlations between the percentage (%) of venodilation by acetylcholine and urinary albumin excretion (UAE; Panel A), % of venodilation by acetylcholine and HbA<sub>1c</sub> (Panel B), and % of venodilation by acetylcholine and flow-mediated vasodilation (Panel C). White circles = normoalbuminuric group; black circles = microalbuminuric group.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

### Estudo 1:

Pacientes com IRT apresentaram disfunção endotelial venosa no período antecedente à sessão de HD em comparação a controles saudáveis. Uma sessão de HD melhorou a função endotelial venosa desses pacientes, representada por maiores níveis de venodilatação dependente do endotélio, que se aproximou dos valores obtidos nos controles saudáveis. A sessão de HD reduziu a capacidade antioxidante total, no entanto, não promoveu aumento no dano oxidativo a proteínas. Os pacientes que apresentaram menor redução da capacidade antioxidante total após a sessão de HD obtiveram melhores respostas de venodilatação.

A avaliação da função endotelial no leito vascular venoso pode ser uma alternativa para melhor expressar as respostas endoteliais decorrentes da sessão de HD, pois o território venoso, como um sistema vascular de capacitância, expõe-se às grandes alterações e ajustes hemodinâmicos decorrentes da remoção elevada de fluidos corporais pelos processos de filtração e depuração impostos pela diálise. Apesar disso, a técnica de *Dorsal Hand Vein* é um instrumento de avaliação oneroso quanto aos materiais de consumo e drogas, que requer grande disponibilidade de tempo para as medidas (em torno de duas horas), e que, conforme experiência de nosso grupo, pode não ser facilmente aplicável a pacientes com edema periférico ou com acesso venoso precário na região dorsal da mão. Essas últimas limitações se salientam ainda mais na presença de IRT e, diante disso, o nosso estudo foi conduzido com uma amostra pequena de pacientes, também observada nos demais trabalhos envolvendo esse instrumento de avaliação.

A correlação negativa de função endotelial, representada pela venodilatação dependente do endotélio, com a variação da capacidade antioxidante total frente à sessão de HD foi evidenciada no presente estudo, caracterizando o importante papel dos sistemas de defesa antioxidante nas alterações da função endotelial durante a diálise. A redução da capacidade

antioxidante total pode ser uma consequência do maior consumo de antioxidantes durante a sessão de HD, embora não se tenha realizado medidas mais específicas para determinar qual o sistema de defesa antioxidante exerceu maior influência nessas respostas. Além disso, excetuando-se a avaliação de danos a proteínas que não se modificou pela sessão de HD, outros marcadores de dano oxidativo ou de estresse nitrosativo não foram avaliados, caracterizando-se como uma das limitações desse trabalho e, portanto, não se pode afastar a ocorrência de estresse oxidativo aumentado após sessão de HD nesses indivíduos.

Nesse sentido, alternativas terapêuticas que visam minimizar as repercussões da sessão de hemodiálise vêm surgindo em paralelo com o aumento do número de pacientes em terapia renal substitutiva. O uso de dialisadores com vitamina E, com o intuito de minimizar os níveis de estresse oxidativo durante a HD, a terapia anticoagulante com heparina de baixo peso molecular, como fator atenuante da ativação inflamatória, e a terapia renal substitutiva com sessões diárias de HD, objetivando oferecer aos pacientes uma condição mais fisiológica de filtração e depuração sangüínea vêm surgindo como alternativas que podem influenciar positivamente na melhora da função endotelial ou, até mesmo, na reversão da disfunção endotelial destes pacientes, mesmo que agudamente. No entanto, essas estratégias terapêuticas ainda carecem de maior elucidação, especialmente no que se refere aos seus efeitos na função endotelial e estresse oxidativo.

A complexidade dos fatores que interferem na função endotelial frente a uma sessão de HD e a natureza multifatorial dos mecanismos fisiopatológicos da IRT apontam para a necessidade de estudos abrangendo a avaliação da resposta inflamatória, do estresse oxidativo e nitrosativo, de inibidores endógenos da eNOS e de função endotelial em um maior número de pacientes com IRT antes e depois da sessão de HD.

A terapia com eritropoietina recombinante humana objetiva a correção da anemia e esteve integrada ao tratamento dos pacientes envolvidos nesse trabalho. Essa medida

terapêutica pode ter influenciado nas respostas de função endotelial, pois, como já mencionado, a eritropoietina é capaz de mobilizar células endoteliais progenitoras, o que pode contribuir para o reparo da camada de células endoteliais e, conseqüentemente, possibilitar melhores respostas de DDE.

Entre as perspectivas de futuros estudos, surge o interesse em avaliar a influência do uso da eritropoietina na função endotelial venosa frente à sessão de HD, comparando os pacientes já avaliados (tratados com eritropoietina) com pacientes que não estão sendo tratados com eritropoietina. A suplementação com antioxidantes na dieta surge como uma estratégia terapêutica para estes pacientes e também deve ser instrumento de futuros trabalhos conduzidos por nosso grupo.

#### Estudo 2:

Pacientes com DM2 e microalbuminúria apresentaram disfunção endotelial mais acentuada do que o grupo normoalbuminúrico, tanto no leito vascular venoso quanto no arterial, sendo relatada pela primeira vez a presença de disfunção endotelial venosa em pacientes com DM2 e microalbuminúria comparados a pacientes diabéticos com normoalbuminúria. Na análise de correlação envolvendo todos os pacientes, a venodilatação por acetilcolina e a FMD estiveram inversamente correlacionadas com excreção urinária de albumina e com HbA<sub>1c</sub>. A venodilatação por acetilcolina se correlacionou positivamente com a FMD na artéria braquial.

Em nosso estudo não foram incluídos indivíduos saudáveis para a composição de um grupo controle, mas considerando o ponto de corte de normalidade na DDE em 8%, como já mencionado ao longo do texto e adotado em nosso laboratório, a média de FMD esteve reduzida em relação ao esperado. Diante disso, podemos mencionar a ocorrência de disfunção endotelial arterial em pacientes com DM2, mesmo caracterizados como normoalbuminúricos, com bom controle glicêmico e pressórico e sem dislipidemia. Não foi observada redução da

DIE em relação ao esperado ( $> 8\%$ ) ou na comparação entre os grupos, o que sugere a ausência de alteração na musculatura lisa vascular e a não interferência desta na DDE. Esses pacientes não apresentaram evidência clínica de doença aterosclerótica, no entanto, a medida de espessura da camada íntima-média da carótida poderia ser utilizada como uma ferramenta de maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico subclínico de aterosclerose.

Na literatura ainda não está estabelecido um ponto de corte de normalidade para venodilatação mediada por acetilcolina. No entanto, através de vários estudos do nosso grupo com a técnica de *Dorsal Hand Vein* envolvendo indivíduos saudáveis (SIGNORI et al., 2008), hipertensos (RUBIRA et al., 2007), com Doença de Chagas (PLENTZ et al., 2006) e em mulheres com uso de contraceptivos orais (GIRIBELA et al., 2007), optou-se por considerar um valor de 100% como parâmetro de DDE normal a partir da pré-constricção com fenilefrina. Assumindo-se esse ponto de corte, ambos os grupos apresentaram disfunção endotelial venosa que foi mais pronunciada nos pacientes com microalbuminúria. A resposta de DIE correspondeu ao valor esperado ( $> 100\%$ ) e não diferiu entre os grupos.

As correlações de excreção urinária de albumina com as respostas de DDE observadas no presente estudo sugerem que a disfunção endotelial, identificada no leito vascular venoso e arterial, pode estar associada com a evolução da nefropatia diabética. Embora não se tenha realizado medidas de nitritos e nitratos no presente estudo, o achado de que o grupo com microalbuminúria apresentou menor DDE em resposta a acetilcolina e ao *shear stress*, pode representar uma redução da biodisponibilidade de NO, indicando que a disfunção endotelial vascular periférica pode evoluir com a progressão da nefropatia diabética e da aterosclerose.

Os pacientes incluídos nesse estudo apresentaram níveis de  $HbA_{1c} < 7,5\%$  e em ambos os grupos a média de  $HbA_{1c}$  foi menor que 7%, caracterizando um bom controle glicêmico. O achado de uma boa correlação de DDE em ambos os leitos vasculares com  $HbA_{1c}$ , sugere um papel importante do controle glicêmico na função endotelial e que níveis de  $HbA_{1c}$  ainda

menores devem ser requeridos para um melhor controle metabólico de pacientes com DM2. Nesse sentido, a avaliação da variabilidade glicêmica pelo sistema de monitorização contínua de glicose (CGMS) vem surgindo como alternativa que ao ser agregada às medidas de HbA<sub>1c</sub>, pode representar um indicador mais confiável de controle glicêmico do que a medida de HbA<sub>1c</sub> isolada.

Esse trabalho demonstrou pela primeira vez a existência de correlação na respostas de DDE entre o leito venoso e arterial em pacientes com DM2, mesmo diante das diferenças estruturais e funcionais entre estes territórios vasculares. Esse achado sugere que as vias de sinalização celular, que culminam na disfunção endotelial pela hiperglicemia, podem estar afetadas de forma semelhante entre veias e artérias de pacientes com DM2. No entanto, essa hipótese não foi testada em nosso trabalho e deve ser instrumento de maiores investigações.

A presença de disfunção endotelial mais exacerbada nos pacientes com microalbuminúria e detectada em ambos os leitos vasculares periféricos sugerem um processo fisiopatológico comum envolvendo disfunção endotelial periférica, potencialmente relacionada à doença vascular periférica, e microalbuminúria em pacientes com DM2.

As estratégias de tratamento da doença cardiovascular no DM2, especialmente na presença de microalbuminúria, deve ter como principal alvo-terapêutico a melhora na função endotelial com o intuito de retardar o surgimento de nefropatia diabética, o processo aterosclerótico e de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular.

A avaliação do estresse oxidativo desses pacientes em amostras de sangue coletadas e armazenadas no momento da avaliação da função endotelial, podem viabilizar um melhor entendimento da relação entre disfunção endotelial e microalbuminúria. Essas medidas não foram executadas até o momento, pois dependem da padronização de algumas técnicas em nosso laboratório.

Outro trabalho que vem sendo realizado pelo nosso grupo de pesquisadores encontra-se em fase avançada de coleta de dados, e envolve a avaliação da função endotelial venosa em pacientes com DM2 em tratamento com insulina, os quais não compuseram a amostra do presente trabalho. A técnica de *Dorsal Hand Vein* permite a infusão de drogas a baixas concentrações que ocasiona efeito momentâneo, somente em um pequeno segmento da veia dorsal da mão, possibilitando o bloqueio de vias de sinalização intracelular no endotélio, sem a ocorrência de efeitos sistêmicos. Diante disso, nosso grupo vem avaliando o papel da cicloxigenase na reatividade vascular venosa em jejum e após sobrecarga lipídica oral em indivíduos saudáveis, através do bloqueio da via da cicloxigenase com aspirina (artigo em avaliação). Estudos envolvendo esse delineamento experimental podem contribuir para o melhor entendimento da relação entre lipemia pós-prandial e função endotelial de pacientes com DM2.

Entre os futuros estudos a serem conduzidos por nosso grupo em pacientes com DM2, surge o interesse na investigação da associação entre a variabilidade glicêmica, avaliada pelo sistema de monitorização contínua de glicose (CGMS), a HbA<sub>1c</sub> e a função endotelial em pacientes com bom controle glicêmico.

## 6 REFERÊNCIAS

- AELLIG, W. H. A new technique for recording compliance of human hand veins. **Br J Clin Pharmacol**, v.11, n.3, Mar, p.237-43. 1981.
- AELLIG, W. H. Clinical pharmacology, physiology and pathophysiology of superficial veins-1. **Br J Clin Pharmacol**, v.38, n.3, Sep, p.181-96. 1994.
- ANDERSON, R. A.; EVANS, M. L.; ELLIS, G. R.; GRAHAM, J.; MORRIS, K.; JACKSON, S. K.; LEWIS, M. J.; REES, A.; FRENNEAUX, M. P. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v.154, n.2, Feb 1, p.475-83. 2001.
- ANDRIES, L. J.; BRUTSAERT, D. L.; SYS, S. U. Nonuniformity of endothelial constitutive nitric oxide synthase distribution in cardiac endothelium. **Circ Res**, v.82, n.2, Feb 9, p.195-203. 1998.
- ANNUK, M.; ZILMER, M.; LIND, L.; LINDE, T.; FELLSTROM, B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v.12, n.12, Dec, p.2747-52. 2001.
- ARNADOTTIR, M.; WINGREN, K.; HULTBERG, B.; HEGBRANT, J. The postdialytic rise in the plasma total homocysteine concentration is delayed. **Blood Purif**, v.20, n.4, p.334-7. 2002.
- ARNER, M.; HOGESTATT, E. D. Endothelium-dependent relaxation and effects of prostacyclin, endothelin and platelet-activating factor in human hand veins and arteries. **Acta Physiol Scand**, v.142, n.2, Jun, p.165-72. 1991.
- ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DER ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G.; ISNER, J. M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v.275, n.5302, Feb 14, p.964-7. 1997.
- AVOGARO, A.; FADINI, G. P.; GALLO, A.; PAGNIN, E.; DE KREUTZENBERG, S. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.16 Suppl 1, Mar, p.S39-45. 2006.
- AVOGARO, A.; PAGNIN, E.; CALO, L. Monocyte NADPH oxidase subunit p22(phox) and inducible hemeoxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.4, Apr, p.1753-9. 2003a.
- AVOGARO, A.; TOFFOLO, G.; KIWANUKA, E.; DE KREUTZENBERG, S. V.; TESSARI, P.; COBELLI, C. L-arginine-nitric oxide kinetics in normal and type 2 diabetic subjects: a stable-labelled <sup>15</sup>N arginine approach. **Diabetes**, v.52, n.3, Mar, p.795-802. 2003b.
- BACHMANN, S.; BOSSE, H. M.; MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **Am J Physiol**, v.268, n.5 Pt 2, May, p.F885-98. 1995.

BAIGENT, C.; BURBURY, K.; WHEELER, D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. **Lancet**, v.356, n.9224, Jul 8, p.147-52. 2000.

BARROS, E.; MANFRO, R. C.; THOMÉ, L. F. S.; GONÇALVES, L. F. S. Prevenção das Doenças Renais. In: THOMÉ, F. S.; BARROS, E. (Ed.). **Nefrologia: Rotinas, Diagnóstico e Tratamento**, v.2, 1999. p.55-67

BECKMAN, J. A.; GOLDFINE, A. B.; DUNAIF, A.; GERHARD-HERMAN, M.; CREAGER, M. A. Endothelial function varies according to insulin resistance disease type. **Diabetes Care**, v.30, n.5, May, p.1226-32. 2007.

BENJAMIN, E. J.; LARSON, M. G.; KEYES, M. J.; MITCHELL, G. F.; VASAN, R. S.; KEANEY, J. F., JR.; LEHMAN, B. T.; FAN, S.; OSYPIUK, E.; VITA, J. A. Clinical correlates and heritability of flow-mediated dilation in the community: the Framingham Heart Study. **Circulation**, v.109, n.5, Feb 10, p.613-9. 2004.

BENJAMIN, N.; CALVER, A.; COLLIER, J.; ROBINSON, B.; VALLANCE, P.; WEBB, D. Measuring forearm blood flow and interpreting the responses to drugs and mediators. **Hypertension**, v.25, n.5, May, p.918-23. 1995.

BOGER, R. H.; LENTZ, S. R.; BODE-BOGER, S. M.; KNAPP, H. R.; HAYNES, W. G. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. **Clin Sci (Lond)**, v.100, n.2, Feb, p.161-7. 2001.

BOGER, R. H.; ZOCCALI, C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. **Atheroscler Suppl**, v.4, n.4, Dec, p.23-8. 2003.

BOLTON, C. H.; DOWNS, L. G.; VICTORY, J. G.; DWIGHT, J. F.; TOMSON, C. R.; MACKNESS, M. I.; PINKNEY, J. H. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. **Nephrol Dial Transplant**, v.16, n.6, Jun, p.1189-97. 2001.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, n.2, Feb 1, p.168-75. 2003.

BORAWSKI, J.; NAUMNIK, B.; PAWLAK, K.; MYSLIWIEC, M. Endothelial dysfunction marker von Willebrand factor antigen in haemodialysis patients: associations with pre-dialysis blood pressure and the acute phase response. **Nephrol Dial Transplant**, v.16, n.7, Jul, p.1442-7. 2001.

BOSTOM, A. G.; LATHROP, L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. **Kidney Int**, v.52, n.1, Jul, p.10-20. 1997.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, n.6, Jun, p.1615-25. 2005.

BUCALA, R.; TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. **J Clin Invest**, v.87, n.2, Feb, p.432-8. 1991.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? **Br J Nutr**, v.93, n.1, Jan, p.3-9. 2005.

CABALLERO, A. E.; ARORA, S.; SAOUAF, R.; LIM, S. C.; SMAKOWSKI, P.; PARK, J. Y.; KING, G. L.; LOGERFO, F. W.; HORTON, E. S.; VEVES, A. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, n.9, Sep, p.1856-62. 1999.

CELERMAJER, D. S.; SORENSEN, K. E.; GOOCH, V. M.; SPIEGELHALTER, D. J.; MILLER, O. I.; SULLIVAN, I. D.; LLOYD, J. K.; DEANFIELD, J. E. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. **Lancet**, v.340, n.8828, Nov 7, p.1111-5. 1992.

CELOTTO, G.; BEVILACQUA, M.; PAPPARELLA, I.; BARITONO, E.; FRANCO, L.; CORVAJA, C.; MAZZONI, M.; SEMPLICINI, A.; AVOGARO, A. Insulin generates free radicals by an NAD(P)H, phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo. **Diabetes**, v.53, n.5, May, p.1344-51. 2004.

CHAN, S. Y.; MANCINI, G. B.; KURAMOTO, L.; SCHULZER, M.; FROHLICH, J.; IGNASZEWSKI, A. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol**, v.42, n.6, Sep 17, p.1037-43. 2003.

CIACCIO, M.; BIVONA, G.; DI SCIACCA, R.; IATRINO, R.; DI NATALE, E.; LI VECCHI, M.; BELLIA, C. Changes in serum fetuin-A and inflammatory markers levels in end-stage renal disease (ESRD): effect of a single session haemodialysis. **Clin Chem Lab Med**, Dec 13. 2007.

COLAK, E.; MAJKIC-SINGH, N.; STANKOVIC, S.; SRECKOVIC-DIMITRIJEVIC, V.; DJORDJEVIC, P.; LALIC, K.; LALIC, N. Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. **Annals of Medicine**, v.37, n.8, p.613-620. 2005.

COLLIER, J.; VALLANCE, P. Biphasic response to acetylcholine in human veins in vivo: the role of the endothelium. **Clin Sci (Lond)**, v.78, n.1, Jan, p.101-4. 1990.

CORRETTI, M. C.; ANDERSON, T. J.; BENJAMIN, E. J.; CELERMAJER, D.; CHARBONNEAU, F.; CREAGER, M. A.; DEANFIELD, J.; DREXLER, H.; GERHARD-HERMAN, M.; HERRINGTON, D.; VALLANCE, P.; VITA, J.; VOGEL, R. 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**, v.39, n.2, Jan 16, p.257-65. 2002.

COSENTINO, F.; ETO, M.; DE PAOLIS, P.; VAN DER LOO, B.; BACHSCHMID, M.; ULLRICH, V.; KOUROEDOV, A.; DELLI GATTI, C.; JOCH, H.; VOLPE, M.; LUSCHER, T. F. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in

human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. **Circulation**, v.107, n.7, Feb 25, p.1017-23. 2003.

COSSON, E.; PHAM, I.; VALENSI, P.; PARIES, J.; ATTALI, J. R.; NITENBERG, A. Impaired coronary endothelium-dependent vasodilation is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes and angiographically normal coronary arteries. **Diabetes Care**, v.29, n.1, Jan, p.107-12. 2006.

CROSS, J. M.; DONALD, A.; VALLANCE, P. J.; DEANFIELD, J. E.; WOOLFSON, R. G.; MACALLISTER, R. J. Dialysis improves endothelial function in humans. **Nephrol Dial Transplant**, v.16, n.9, Sep, p.1823-9. 2001.

DA LUZ, P.; LAURINDO, F.; CHAGAS, A. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu. 2003

DAMSGAARD, E. M.; FROLAND, A.; JORGENSEN, O. D.; MOGENSEN, C. E. Microalbuminuria as predictor of increased mortality in elderly people. **Bmj**, v.300, n.6720, Feb 3, p.297-300. 1990.

DECKERT, T.; FELDT-RASMUSSEN, B.; BORCH-JOHNSEN, K.; JENSEN, T.; KOFOED-ENEVOLDSEN, A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. **Diabetologia**, v.32, n.4, Apr, p.219-26. 1989.

DEL BIANCO, P. L.; SICUTERI, F. [Test of venoconstriction in humans; an improved technic for quantitative evaluation of venous spasm]. **Boll Soc Ital Biol Sper**, v.51, n.14, Jul 30, p.883-8. 1975.

DINNEEN, S. F.; GERSTEIN, H. C. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A systematic overview of the literature. **Arch Intern Med**, v.157, n.13, Jul 14, p.1413-8. 1997.

DONALD, A. E.; CHARAKIDA, M.; COLE, T. J.; FRIBERG, P.; CHOWIENCZYK, P. J.; MILLASSEAU, S. C.; DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P. Non-invasive assessment of endothelial function: which technique? **J Am Coll Cardiol**, v.48, n.9, Nov 7, p.1846-50. 2006.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v.15, n.8, Aug, p.1983-92. 2004.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v.23, n.5, Oct, p.599-622. 2002.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch Biochem Biophys**, v.388, n.2, Apr 15, p.261-6. 2001.

FADINI, G. P.; MIORIN, M.; FACCO, M.; BONAMICO, S.; BAESSO, I.; GREGO, F.; MENEGOLO, M.; DE KREUTZENBERG, S. V.; TIENGO, A.; AGOSTINI, C.; AVOGARO, A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular

complications of type 2 diabetes mellitus. **J Am Coll Cardiol**, v.45, n.9, May 3, p.1449-57. 2005.

FARD, A.; TUCK, C. H.; DONIS, J. A.; SCIACCA, R.; DI TULLIO, M. R.; WU, H. D.; BRYANT, T. A.; CHEN, N. T.; TORRES-TAMAYO, M.; RAMASAMY, R.; BERGLUND, L.; GINSBERG, H. N.; HOMMA, S.; CANNON, P. J. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, n.9, Sep, p.2039-44. 2000.

FRICK, M.; SUESSENBACHER, A.; ALBER, H. F.; DICHTL, W.; ULMER, H.; PACHINGER, O.; WEIDINGER, F. Prognostic value of brachial artery endothelial function and wall thickness. **J Am Coll Cardiol**, v.46, n.6, Sep 20, p.1006-10. 2005.

FRIES, J. W.; WILLIAMS, A. J.; ATKINS, R. C.; NEWMAN, W.; LIPSCOMB, M. F.; COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. **Am J Pathol**, v.143, n.3, Sep, p.725-37. 1993.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.

GAENZER, H.; NEUMAYR, G.; MARSCHANG, P.; STURM, W.; KIRCHMAIR, R.; PATSCH, J. R. Flow-mediated vasodilation of the femoral and brachial artery induced by exercise in healthy nonsmoking and smoking men. **J Am Coll Cardiol**, v.38, n.5, Nov 1, p.1313-9. 2001.

GHIADONI, L.; CUPISTI, A.; HUANG, Y.; MATTEI, P.; CARDINAL, H.; FAVILLA, S.; RINDI, P.; BARSOTTI, G.; TADDEI, S.; SALVETTI, A. Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. **J Nephrol**, v.17, n.4, Jul-Aug, p.512-9. 2004.

GIANNATTASIO, C.; ZOPPO, A.; GENTILE, G.; FAILLA, M.; CAPRA, A.; MAGGI, F. M.; CATAPANO, A.; MANCIA, G. Acute effect of high-fat meal on endothelial function in moderately dyslipidemic subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, n.2, Feb, p.406-10. 2005.

GIRIBELA, C. R.; RUBIRA, M. C.; DE MELO, N. R.; PLENTZ, R. D.; DE ANGELIS, K.; MORENO, H.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Effect of a low-dose oral contraceptive on venous endothelial function in healthy young women: preliminary results. **Clinics**, v.62, n.2, Apr, p.151-8. 2007.

GOKCE, N.; KEANEY, J. F., JR.; HUNTER, L. M.; WATKINS, M. T.; NEDELJKOVIC, Z. S.; MENZOIAN, J. O.; VITA, J. A. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. **J Am Coll Cardiol**, v.41, n.10, May 21, p.1769-75. 2003.

GOLDSTEIN, B. J.; MAHADEV, K.; WU, X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. **Diabetes**, v.54, n.2, Feb, p.311-21. 2005.

GOTH, L.; EATON, J. W. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. **Lancet**, v.356, n.9244, Nov 25, p.1820-1. 2000.

GOTH, L.; LENKEY, A.; BIGLER, W. N. Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary. **Diabetes Care**, v.24, n.10, Oct, p.1839-40. 2001.

GREEN, D. J.; WALSH, J. H.; MAIORANA, A.; BEST, M. J.; TAYLOR, R. R.; O'DRISCOLL, J. G. Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: pooled analysis of diverse patient populations. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.285, n.6, Dec, p.H2679-87. 2003.

GRIENGLING, K. K.; FITZGERALD, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v.108, n.16, Oct 21, p.1912-6. 2003.

GROSS, J. L.; DE AZEVEDO, M. J.; SILVEIRO, S. P.; CANANI, L. H.; CARAMORI, M. L.; ZELMANOVITZ, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v.28, n.1, Jan, p.164-76. 2005.

HALLER, M. J.; STEIN, J.; SHUSTER, J.; THERIAQUE, D.; SILVERSTEIN, J.; SCHATZ, D. A.; EARING, M. G.; LERMAN, A.; MAHMUD, F. H. Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**, v.8, n.4, Aug, p.193-8. 2007.

HAMILTON, C. A.; BROSNAN, M. J.; AL-BENNA, S.; BERG, G.; DOMINICZAK, A. F. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. **Hypertension**, v.40, n.5, Nov, p.755-62. 2002.

HAND, M. F.; HAYNES, W. G.; WEBB, D. J. Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. **Kidney Int**, v.53, n.4, Apr, p.1068-77. 1998.

HARADA, K.; OHMORI, M.; KITO, Y.; SUGIMOTO, K.; FUJIMURA, A. Impaired beta-adrenoceptor mediated venodilation in patients with diabetes mellitus. **Br J Clin Pharmacol**, v.47, n.4, Apr, p.427-31. 1999.

HASHIMOTO, M.; AKISHITA, M.; ETO, M.; KOZAKI, K.; AKO, J.; SUGIMOTO, N.; YOSHIZUMI, M.; TOBA, K.; OUCHI, Y. The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.22, n.5, May, p.477-84. 1998.

HAYNES, W. G.; HAND, M. F.; JOHNSTONE, H. A.; PADFIELD, P. L.; WEBB, D. J. Direct and sympathetically mediated venoconstriction in essential hypertension. Enhanced responses to endothelin-1. **J Clin Invest**, v.94, n.4, Oct, p.1359-64. 1994.

HE, G. W. Endothelial function related to vascular tone in cardiac surgery. **Heart Lung Circ**, v.14, n.1, Mar, p.13-8. 2005.

HEESCHEN, C.; AICHER, A.; LEHMANN, R.; FICHTLSCHERER, S.; VASA, M.; URBICH, C.; MILDNER-RIHM, C.; MARTIN, H.; ZEIHNER, A. M.; DIMMELER, S.

Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. **Blood**, v.102, n.4, Aug 15, p.1340-6. 2003.

HENRY, R. M.; FERREIRA, I.; KOSTENSE, P. J.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; HEINE, R. J.; KAMP, O.; BOUTER, L. M.; STEHOUWER, C. D. Type 2 diabetes is associated with impaired endothelium-dependent, flow-mediated dilation, but impaired glucose metabolism is not; The Hoorn Study. **Atherosclerosis**, v.174, n.1, May, p.49-56. 2004.

HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; KAJIYAMA, G.; OSHIMA, T. A noninvasive measurement of reactive hyperemia that can be used to assess resistance artery endothelial function in humans. **Am J Cardiol**, v.87, n.1, Jan 1, p.121-5, A9. 2001.

HIMMELFARB, J.; STENVINKEL, P.; IKIZLER, T. A.; HAKIM, R. M. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. **Kidney Int**, v.62, n.5, Nov, p.1524-38. 2002.

HIRAYAMA, A.; NAGASE, S.; GOTOH, M.; TAKEMURA, K.; TOMIDA, C.; UEDA, A.; AOYAGI, K.; TERAU, J.; KOYAMA, A. Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. **Nephron**, v.86, n.4, Dec, p.436-40. 2000.

HODIS, H. N. Triglyceride-rich lipoprotein remnant particles and risk of atherosclerosis. **Circulation**, v.99, n.22, Jun 8, p.2852-4. 1999.

HOENICH, N. A. Platelet and leucocyte behaviour during haemodialysis. **Contrib Nephrol**, v.125, p.120-32. 1999.

HOGIKYAN, R. V.; GALECKI, A. T.; PITT, B.; HALTER, J. B.; GREENE, D. A.; SUPIANO, M. A. Specific impairment of endothelium-dependent vasodilation in subjects with type 2 diabetes independent of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, n.6, Jun, p.1946-52. 1998.

HONING, M.; MORRISON, P.; STROES, E.; RABELINK, T. Endothelial function in diabetes: a disturbed vascular balance. **Internat Diab Rev**, v.8, p.6-10. 1999.

IHLEMANN, N.; STOKHOLM, K. H.; ESKILDSEN, P. C. Impaired vascular reactivity is present despite normal levels of von Willebrand factor in patients with uncomplicated Type 2 diabetes. **Diabet Med**, v.19, n.6, Jun, p.476-81. 2002.

JOANNIDES, R.; HAEFELI, W. E.; LINDER, L.; RICHARD, V.; BAKKALI, E. H.; THUILLEZ, C.; LUSCHER, T. F. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. **Circulation**, v.91, n.5, Mar 1, p.1314-9. 1995.

JUONALA, M.; VIIKARI, J. S.; LAITINEN, T.; MARNIEMI, J.; HELENIUS, H.; RONNEMAA, T.; RAITAKARI, O. T. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. **Circulation**, v.110, n.18, Nov 2, p.2918-23. 2004.

KANELLAKEI-KYPARISSI, M.; KOUZI-KOLIAKOU, K.; MARINOV, G.; KNYAZEV, V. Histological study of arterial and venous grafts before their use in aortocoronary bypass surgery. **Hellenic J Cardiol**, v.46, n.1, Jan-Feb, p.21-30. 2005.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. **Jama**, v.241, n.19, May 11, p.2035-8. 1979.

KATO, M.; SHIODE, N.; YAMAGATA, T.; MATSUURA, H.; KAJIYAMA, G. Coronary segmental responses to acetylcholine and bradykinin in patients with atherosclerotic risk factors. **Am J Cardiol**, v.80, n.6, Sep 15, p.751-5. 1997.

KAWANO, H.; MOTOYAMA, T.; HIRASHIMA, O.; HIRAI, N.; MIYAO, Y.; SAKAMOTO, T.; KUGIYAMA, K.; OGAWA, H.; YASUE, H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. **J Am Coll Cardiol**, v.34, n.1, Jul, p.146-54. 1999.

KHAN, F.; ELHADD, T. A.; GREENE, S. A.; BELCH, J. J. Impaired skin microvascular function in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.23, n.2, Feb, p.215-20. 2000.

KIELSTEIN, J. T.; BODE-BOGER, S. M.; FROLICH, J. C.; RITZ, E.; HALLER, H.; FLISER, D. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. **Circulation**, v.107, n.14, Apr 15, p.1891-5. 2003.

KIELSTEIN, J. T.; BOGER, R. H.; BODE-BOGER, S. M.; SCHAFFER, J.; BARBEY, M.; KOCH, K. M.; FROLICH, J. C. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. **J Am Soc Nephrol**, v.10, n.3, Mar, p.594-600. 1999.

KNAPIK-KORDECKA, M.; PIWOWAR, A.; WARWAS, M. [Oxidative-antioxidative balance disturbance and risk factors as well as vascular complications in patients with diabetes type 2]. **Wiad Lek**, v.60, n.7-8, p.329-34. 2007.

KOOMAN, J. P.; VAN HOOFF, J. P.; LEUNISSEN, K. M. The venous system and dialysis-associated hypotension. **Contrib Nephrol**, v.106, p.99-105. 1994.

KOPPENOL, W. H.; MORENO, J. J.; PRYOR, W. A.; ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J. S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. **Chem Res Toxicol**, v.5, n.6, Nov-Dec, p.834-42. 1992.

KOSCH, M.; LEVERS, A.; BARENBRÖCK, M.; MATZKIES, F.; SCHAEFER, R. M.; KISTERS, K.; RAHN, K. H.; HAUSBERG, M. Acute effects of haemodialysis on endothelial function and large artery elasticity. **Nephrol Dial Transplant**, v.16, n.8, Aug, p.1663-8. 2001.

KOSCH, M.; LEVERS, A.; FÖBKER, M.; BARENBRÖCK, M.; SCHAEFER, R. M.; RAHN, K. H.; HAUSBERG, M. Dialysis filter type determines the acute effect of haemodialysis on endothelial function and oxidative stress. **Nephrol Dial Transplant**, v.18, n.7, Jul, p.1370-5. 2003.

KRZYZANOWSKA, K.; MITTERMAYER, F.; KRUGLUGER, W.; SCHNACK, C.; HOFER, M.; WOLZT, M.; SCHERNTHANER, G. Asymmetric dimethylarginine is associated with macrovascular disease and total homocysteine in patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v.189, n.1, Nov, p.236-40. 2006.

KRZYZANOWSKA, K.; MITTERMAYER, F.; WOLZT, M.; SCHERNTHANER, G. Asymmetric dimethylarginine predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.30, n.7, Jul, p.1834-9. 2007.

KUVIN, J. T.; PATEL, A. R.; KARAS, R. H. Need for standardization of noninvasive assessment of vascular endothelial function. **Am Heart J**, v.141, n.3, Mar, p.327-8. 2001.

LANDMESSER, U.; DIKALOV, S.; PRICE, S. R.; MCCANN, L.; FUKAI, T.; HOLLAND, S. M.; MITCH, W. E.; HARRISON, D. G. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **J Clin Invest**, v.111, n.8, Apr, p.1201-9. 2003.

LANDMESSER, U.; DREXLER, H. The clinical significance of endothelial dysfunction. **Curr Opin Cardiol**, v.20, n.6, Nov, p.547-51. 2005.

LAURINDO, F. R. M.; PILEGGI, L. P. Endotélio: funções normais e papel na aterosclerose. In: SOCESP (Ed.). **SOCESP - Cardiologia, atualização e reciclagem**. São Paulo: Atheneu, 1994. p.245-254

LERMAN, A.; ZEIHNER, A. M. Endothelial function: cardiac events. **Circulation**, v.111, n.3, Jan 25, p.363-8. 2005.

LEVEY, A. S.; CORESH, J.; BALK, E.; KAUSZ, A. T.; LEVIN, A.; STEFFES, M. W.; HOGG, R. J.; PERRONE, R. D.; LAU, J.; EKNOYAN, G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Ann Intern Med**, v.139, n.2, Jul 15, p.137-47. 2003.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.868-74. 2002.

LILJEN, M. R.; KOOMANS, H. A.; SCHRODER, C. H. Hemodialysis acutely impairs endothelial function in children. **Pediatr Nephrol**, v.20, n.2, Feb, p.200-4. 2005.

LINDNER, A.; CHARRA, B.; SHERRARD, D. J.; SCRIBNER, B. H. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. **N Engl J Med**, v.290, n.13, Mar 28, p.697-701. 1974.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radic Res Commun**, v.17, n.5, p.299-311. 1992.

LOCATELLI, F.; MARCELLI, D.; CONTE, F.; D'AMICO, M.; DEL VECCHIO, L.; LIMIDO, A.; MALBERTI, F.; SPOTTI, D. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. **Nephrol Dial Transplant**, v.15 Suppl 5, p.69-80. 2000.

LOVCIC, V.; KES, P.; REINER, Z. [Characteristics of hyperhomocysteinemia in dialysis patients]. **Acta Med Croatica**, v.60, n.1, p.21-6. 2006.

LUSCHER, T. F.; DIEDERICH, D.; SIEBENMANN, R.; LEHMANN, K.; STULZ, P.; VON SEGESSER, L.; YANG, Z. H.; TURINA, M.; GRADEL, E.; WEBER, E.; ET AL. Difference between endothelium-dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. **N Engl J Med**, v.319, n.8, Aug 25, p.462-7. 1988.

LUSCHER, T. F.; YANG, Z.; TSCHUDI, M.; VON SEGESSER, L.; STULZ, P.; BOULANGER, C.; SIEBENMANN, R.; TURINA, M.; BUHLER, F. R. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. **Circ Res**, v.66, n.4, Apr, p.1088-94. 1990.

MACALLISTER, R. J.; RAMBAUSEK, M. H.; VALLANCE, P.; WILLIAMS, D.; HOFFMANN, K. H.; RITZ, E. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v.11, n.12, Dec, p.2449-52. 1996.

MAHMUD, F. H.; EARING, M. G.; LEE, R. A.; LTEIF, A. N.; DRISCOLL, D. J.; LERMAN, A. Altered Endothelial Function in Asymptomatic Male Adolescents with Type 1 Diabetes. **Congenital Heart Disease**, v.1, n.3, p.98-103. 2006.

MAKINO, H.; DOI, K.; HIUGE, A.; NAGUMO, A.; OKADA, S.; MIYAMOTO, Y.; SUZUKI, M.; YOSHIMASA, Y. Impaired flow-mediated vasodilatation and insulin resistance in type 2 diabetic patients with albuminuria. **Diabetes Res Clin Pract**, v.79, n.1, Jan, p.177-82. 2008.

MALLAMACI, F.; ZOCCALI, C.; TRIPEPI, G.; FERMO, I.; BENEDETTO, F. A.; CATALIOTTI, A.; BELLANUOVA, I.; MALATINO, L. S.; SOLDARINI, A. Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. **Kidney Int**, v.61, n.2, Feb, p.609-14. 2002.

MANCINI, G. B. Vascular structure versus function: is endothelial dysfunction of independent prognostic importance or not? **J Am Coll Cardiol**, v.43, n.4, Feb 18, p.624-8. 2004.

MANNUCCI, P. M. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.18, n.9, Sep, p.1359-62. 1998.

MCGREGOR, D. O.; BUTTIMORE, A. L.; LYNN, K. L.; YANDLE, T.; NICHOLLS, M. G. Effects of long and short hemodialysis on endothelial function: a short-term study. **Kidney Int**, v.63, n.2, Feb, p.709-15. 2003.

MEIGS, J. B.; O'DONNELL C, J.; TOFLER, G. H.; BENJAMIN, E. J.; FOX, C. S.; LIPINSKA, I.; NATHAN, D. M.; SULLIVAN, L. M.; D'AGOSTINO, R. B.; WILSON, P. W. Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. **Diabetes**, v.55, n.2, Feb, p.530-7. 2006.

MEYER, B.; MORTL, D.; STRECKER, K.; HULSMANN, M.; KULEMANN, V.; NEUNTEUFL, T.; PACHER, R.; BERGER, R. Flow-mediated vasodilation predicts outcome in patients with chronic heart failure: comparison with B-type natriuretic peptide. **J Am Coll Cardiol**, v.46, n.6, Sep 20, p.1011-8. 2005.

MEZZANO, D.; ESPANA, F.; PANES, O.; MEDINA, P.; PAIS, E.; MARSHALL, G.; TAGLE, R.; DOWNEY, P.; CACERES, S.; GONZALEZ, F.; QUIROGA, T.; PEREIRA, J. Increased activation of protein C, but lower plasma levels of free, activated protein C in uraemic patients: relationship with systemic inflammation and haemostatic activation. **Br J Haematol**, v.113, n.4, Jun, p.905-10. 2001.

MIGLIACCI, R.; FALCINELLI, F.; IMPERIALI, P.; FLORIDI, A.; NENCI, G. G.; GRESELE, P. Endothelial dysfunction in patients with kidney failure and vascular risk factors: acute effects of hemodialysis. **Ital Heart J**, v.5, n.5, May, p.371-7. 2004.

MILSTIEN, S.; KATUSIC, Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. **Biochem Biophys Res Commun**, v.263, n.3, Oct 5, p.681-4. 1999.

MIYAZAKI, H.; MATSUOKA, H.; ITABE, H.; USUI, M.; UEDA, S.; OKUDA, S.; IMAIZUMI, T. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. **Circulation**, v.101, n.9, Mar 7, p.1002-6. 2000.

MOGENSEN, C. E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. **N Engl J Med**, v.310, n.6, Feb 9, p.356-60. 1984.

MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, v.31, n.1, Jan, p.61-74. 1999.

MONTAGNANI, M.; RAVICHANDRAN, L. V.; CHEN, H.; ESPOSITO, D. L.; QUON, M. J. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. **Mol Endocrinol**, v.16, n.8, Aug, p.1931-42. 2002.

MORENO, H., JR.; CHALON, S.; URAE, A.; TANGPHAO, O.; ABIOSE, A. K.; HOFFMAN, B. B.; BLASCHKE, T. F. Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. **Am J Physiol**, v.275, n.3 Pt 2, Sep, p.H1040-5. 1998.

MORRIS, S. T.; JARDINE, A. G. The vascular endothelium in chronic renal failure. **J Nephrol**, v.13, n.2, Mar =Apr, p.96-105. 2000.

MOUSTAPHA, A.; NASO, A.; NAHLAWI, M.; GUPTA, A.; ARHEART, K. L.; JACOBSEN, D. W.; ROBINSON, K.; DENNIS, V. W. Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease. **Circulation**, v.97, n.2, Jan 20, p.138-41. 1998.

MURUSSI, M.; CAMPAGNOLO, N.; BECK, M. O.; GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P. High-normal levels of albuminuria predict the development of micro- and macroalbuminuria and

increased mortality in Brazilian Type 2 diabetic patients: an 8-year follow-up study. **Diabet Med**, v.24, n.10, Oct, p.1136-42. 2007.

NEUNTEUFL, T.; KATZENSCHLAGER, R.; HASSAN, A.; KLAAR, U.; SCHWARZACHER, S.; GLOGAR, D.; BAUER, P.; WEIDINGER, F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.129, n.1, Feb 28, p.111-8. 1997.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X. L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M. A.; BEEBE, D.; OATES, P. J.; HAMMES, H. P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v.404, n.6779, Apr 13, p.787-90. 2000.

NYSTROM, T.; NYGREN, A.; SJOHOLM, A. Persistent endothelial dysfunction is related to elevated C-reactive protein (CRP) levels in Type II diabetic patients after acute myocardial infarction. **Clin Sci (Lond)**, v.108, n.2, Feb, p.121-8. 2005.

PANNIER, B.; GUERIN, A. P.; MARCHAIS, S. J.; METIVIER, F.; SAFAR, M. E.; LONDON, G. M. Postischemic vasodilation, endothelial activation, and cardiovascular remodeling in end-stage renal disease. **Kidney Int**, v.57, n.3, Mar, p.1091-9. 2000.

PANZA, J. A.; QUYYUMI, A. A.; BRUSH, J. E., JR.; EPSTEIN, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med**, v.323, n.1, Jul 5, p.22-7. 1990.

PAPAIIOANNOU, G. I.; SEIP, R. L.; GREY, N. J.; KATTEN, D.; TAYLOR, A.; INZUCCHI, S. E.; YOUNG, L. H.; CHYUN, D. A.; DAVEY, J. A.; WACKERS, F. J.; ISKANDRIAN, A. E.; RATNER, R. E.; ROBINSON, E. C.; CAROLAN, S.; ENGEL, S.; HELLER, G. V. Brachial artery reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria (from the Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics-brachial artery reactivity study). **Am J Cardiol**, v.94, n.3, Aug 1, p.294-9. 2004.

PLENTZ, R. D.; IRIGOYEN, M. C.; MULLER, A. S.; CASARINI, D. E.; RUBIRA, M. C.; MORENO JUNIOR, H.; MADY, C.; IANNI, B. M.; KRIEGER, E. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F. [Venous endothelial dysfunction in Chagas' disease patients without heart failure]. **Arq Bras Cardiol**, v.86, n.6, Jun, p.466-71. 2006.

POMILIO, M.; MOHN, A.; VERROTTI, A.; CHIARELLI, F. Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v.15, n.4, Apr, p.343-61. 2002.

POYRAZOGLU, O. K.; DOGUKAN, A.; YALNIZ, M.; SECKIN, D.; GUNAL, A. L. Acute effect of standard heparin versus low molecular weight heparin on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. **Ren Fail**, v.28, n.8, p.723-7. 2006.

RATNAM, S.; MOOKERJEA, S. The regulation of superoxide generation and nitric oxide synthesis by C-reactive protein. **Immunology**, v.94, n.4, Aug, p.560-8. 1998.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v.233, p.357-63. 1994.

- RUBIRA, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; RABELO, E. R.; YUGAR-TOLEDO, J. C.; CASARINI, D.; COIMBRA, S. R.; MARTINS, L. C.; MORENO, H., JR.; KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C. Venous or arterial endothelium evaluation for early cardiovascular dysfunction in hypertensive patients? **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v.9, n.11, Nov, p.859-65. 2007.
- RUDERMAN, N. B.; CACICEDO, J. M.; ITANI, S.; YAGIHASHI, N.; SAHA, A. K.; YE, J. M.; CHEN, K.; ZOU, M.; CARLING, D.; BODEN, G.; COHEN, R. A.; KEANEY, J.; KRAEGER, E. W.; IDO, Y. Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes. **Biochem Soc Trans**, v.31, n.Pt 1, Feb, p.202-6. 2003.
- SCHACHINGER, V.; BRITTEN, M. B.; ZEIHNER, A. M. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. **Circulation**, v.101, n.16, Apr 25, p.1899-906. 2000.
- SCHETTLER, V.; WIELAND, E.; VERWIEBE, R.; SCHUFF-WERNER, P.; SCHELER, F.; OELLERICH, M. Plasma lipids are not oxidized during hemodialysis. **Nephron**, v.67, n.1, p.42-7. 1994.
- SCHIFFRIN, E. L.; INTENGAN, H. D.; THIBAUT, G.; TOUYZ, R. M. Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. **Curr Opin Cardiol**, v.12, n.4, Jul, p.354-67. 1997.
- SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. **J Am Coll Cardiol**, v.42, n.5, Sep 3, p.911-3. 2003.
- SCHULTE, K. L.; LABER, E.; MEYER-SABELLEK, W. A.; DISTLER, A.; GOTZEN, R. Specific alpha-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in human veins and interaction with the calcium entry blockers nifedipine and diltiazem. **J Hypertens Suppl**, v.3, n.3, Dec, p.S239-41. 1985.
- SEIDEL, C. L.; LAROCHELLE, J. Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. **Circ Res**, v.60, n.4, Apr, p.626-30. 1987.
- SELIGMAN, B. G.; BIOLO, A.; POLANCZYK, C. A.; GROSS, J. L.; CLAUSELL, N. Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. **Diabetes Care**, v.23, n.9, Sep, p.1395-400. 2000.
- SHEETZ, M. J.; KING, G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **Jama**, v.288, n.20, Nov 27, p.2579-88. 2002.
- SHIMBO, D.; GRAHAME-CLARKE, C.; MIYAKE, Y.; RODRIGUEZ, C.; SCIACCA, R.; DI TULLIO, M.; BODEN-ALBALA, B.; SACCO, R.; HOMMA, S. The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multi-ethnic cohort. **Atherosclerosis**, v.192, n.1, May, p.197-203. 2007.

SICUTERI, F.; FANCIULLACCI, M.; DEL BIANCO, P. L. Alpha and beta adrenergic receptors in human veins; activity of a new beta-blocking agent. **Med Pharmacol Exp Int J Exp Med**, v.15, n.1, p.73-8. 1966.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v.82, n.2, Mar, p.291-5. 1997.

SIGNORI, L. U.; VARGAS DA SILVA, A. M.; DELLA MEA PLENTZ, R.; GELONEZE, B.; MORENO, H., JR.; BELLO-KLEIN, A.; IRIGOYEN, M. C.; D'AGORD SCHAAN, B. Reduced venous endothelial responsiveness after oral lipid overload in healthy volunteers. **Metabolism**, v.57, n.1, Jan, p.103-9. 2008.

STEHOUWER, C. D.; FISCHER, H. R.; VAN KUIJK, A. W.; POLAK, B. C.; DONKER, A. J. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. **Diabetes**, v.44, n.5, May, p.561-4. 1995.

STEHOUWER, C. D.; GALL, M. A.; TWISK, J. W.; KNUDSEN, E.; EMEIS, J. J.; PARVING, H. H. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. **Diabetes**, v.51, n.4, Apr, p.1157-65. 2002.

STUHLINGER, M. C.; OKA, R. K.; GRAF, E. E.; SCHMOLZER, I.; UPSON, B. M.; KAPOOR, O.; SZUBA, A.; MALINOW, M. R.; WASCHER, T. C.; PACHINGER, O.; COOKE, J. P. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. **Circulation**, v.108, n.8, Aug 26, p.933-8. 2003.

SUWAIDI, J. A.; HAMASAKI, S.; HIGANO, S. T.; NISHIMURA, R. A.; HOLMES, D. R., JR.; LERMAN, A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. **Circulation**, v.101, n.9, Mar 7, p.948-54. 2000.

SZMITKO, P. E.; FEDAK, P. W.; WEISEL, R. D.; STEWART, D. J.; KUTRYK, M. J.; VERMA, S. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. **Circulation**, v.107, n.24, Jun 24, p.3093-100. 2003a.

SZMITKO, P. E.; WANG, C. H.; WEISEL, R. D.; DE ALMEIDA, J. R.; ANDERSON, T. J.; VERMA, S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. **Circulation**, v.108, n.16, Oct 21, p.1917-23. 2003b.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v.42, n.6, Dec, p.1075-81. 2003.

THOM, S.; HUGHES, A.; MARTIN, G.; SEVER, P. S. Endothelium-dependent relaxation in isolated human arteries and veins. **Clin Sci (Lond)**, v.73, n.5, Nov, p.547-52. 1987.

TOUYZ, R. M.; CHEN, X.; TABET, F.; YAO, G.; HE, G.; QUINN, M. T.; PAGANO, P. J.; SCHIFFRIN, E. L. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. **Circ Res**, v.90, n.11, Jun 14, p.1205-13. 2002.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v.34, n.4 Pt 2, Oct, p.976-82. 1999.

VALLANCE, P. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. **Cardiovasc Res**, v.45, n.1, Jan 1, p.143-7. 2000.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. **Cardiovasc Res**, v.23, n.12, Dec, p.1053-7. 1989.

VALLANCE, P.; LEONE, A.; CALVER, A.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet**, v.339, n.8793, Mar 7, p.572-5. 1992.

VAZIRI, N.; NI, Z.; WANG, X.; OVEISI, F.; ZHOU, X. Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. **American Journal of Physiology- Renal Physiology**, v.274, n.4, p.642-649. 1998.

VAZIRI, N. D. Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.13, n.1, Jan, p.93-9. 2004.

VAZIRI, N. D.; NI, Z.; OVEISI, F.; LIANG, K.; PANDIAN, R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. **Hypertension**, v.39, n.1, Jan, p.135-41. 2002.

VENUGOPAL, S. K.; DEVARAJ, S.; YUHANNA, I.; SHAUL, P.; JIALAL, I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. **Circulation**, v.106, n.12, Sep 17, p.1439-41. 2002.

VERMA, S.; WANG, C. H.; LI, S. H.; DUMONT, A. S.; FEDAK, P. W.; BADIWALA, M. V.; DHILLON, B.; WEISEL, R. D.; LI, R. K.; MICKLE, D. A.; STEWART, D. J. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, v.106, n.8, Aug 20, p.913-9. 2002.

VIBERTI, G. C.; HILL, R. D.; JARRETT, R. J.; ARGYROPOULOS, A.; MAHMUD, U.; KEEN, H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. **Lancet**, v.1, n.8287, Jun 26, p.1430-2. 1982.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; CARDINAL, H.; FAVILLA, S.; DURANTI, P.; BIRINDELLI, R.; MAGAGNA, A.; BERNINI, G.; SALVETTI, G.; TADDEI, S.; SALVETTI, A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v.38, n.4, Oct, p.1106-15. 2001.

VIRDIS, A.; IGLARZ, M.; NEVES, M. F.; AMIRI, F.; TOUYZ, R. M.; ROZEN, R.; SCHIFFRIN, E. L. Effect of hyperhomocystinemia and hypertension on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, n.8, Aug 1, p.1352-7. 2003.

VITA, J. A.; KEANEY, J. F., JR. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? **Circulation**, v.106, n.6, Aug 6, p.640-2. 2002.

WADE, M. L.; FITZPATRICK, F. A. Nitric oxide modulates the activity of the hemoproteins prostaglandin I2 synthase and thromboxane A2 synthase. **Arch Biochem Biophys**, v.347, n.2, Nov 15, p.174-80. 1997.

WAJCHENBERG, B. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, p.514-519. 2002.

WEIR, M. R. Microalbuminuria and cardiovascular disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.2, n.3, May, p.581-90. 2007.

WIDLANSKY, M. E.; GOKCE, N.; KEANEY, J. F., JR.; VITA, J. A. The clinical implications of endothelial dysfunction. **J Am Coll Cardiol**, v.42, n.7, Oct 1, p.1149-60. 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, n.5, May, p.1047-53. 2004.

WITTE, D. R.; WESTERINK, J.; DE KONING, E. J.; VAN DER GRAAF, Y.; GROBBEE, D. E.; BOTS, M. L. Is the association between flow-mediated dilation and cardiovascular risk limited to low-risk populations? **J Am Coll Cardiol**, v.45, n.12, Jun 21, p.1987-93. 2005.

WOODMAN, R. J.; WATTS, G. F.; PUDDEY, I. B.; BURKE, V.; MORI, T. A.; HODGSON, J. M.; BEILIN, L. J. Leukocyte count and vascular function in Type 2 diabetic subjects with treated hypertension. **Atherosclerosis**, v.163, n.1, Jul, p.175-81. 2002.

WRATTEN, M. L.; TETTA, C.; URSINI, F.; SEVANIAN, A. Oxidant stress in hemodialysis: prevention and treatment strategies. **Kidney Int Suppl**, v.76, Aug, p.S126-32. 2000.

YANG, Z. H.; VON SEGESSER, L.; BAUER, E.; STULZ, P.; TURINA, M.; LUSCHER, T. F. Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. **Circ Res**, v.68, n.1, Jan, p.52-60. 1991.

YEBOAH, J.; CROUSE, J. R.; HSU, F. C.; BURKE, G. L.; HERRINGTON, D. M. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. **Circulation**, v.115, n.18, May 8, p.2390-7. 2007.

YEUN, J. Y.; LEVINE, R. A.; MANTADILOK, V.; KAYSEN, G. A. C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v.35, n.3, Mar, p.469-76. 2000.

YILMAZ, M. I.; SAGLAM, M.; CAGLAR, K.; CAKIR, E.; SONMEZ, A.; OZGURTAS, T.; AYDIN, A.; EYILETEN, T.; OZCAN, O.; ACIKEL, C.; TASAR, M.; GENCTOY, G.; ERBIL, K.; VURAL, A.; ZOCCALI, C. The determinants of endothelial dysfunction in CKD: oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. **Am J Kidney Dis**, v.47, n.1, Jan, p.42-50. 2006.

YU, Y.; SUO, L.; YU, H.; WANG, C.; TANG, H. Insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes patients with or without microalbuminuria. **Diabetes Res Clin Pract**, v.65, n.2, Aug, p.95-104. 2004.

ZIMMERMANN, J.; HERRLINGER, S.; PRUY, A.; METZGER, T.; WANNER, C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. **Kidney Int**, v.55, n.2, Feb, p.648-58. 1999.

ZOCCALI, C.; BODE-BOGER, S.; MALLAMACI, F.; BENEDETTO, F.; TRIPEPI, G.; MALATINO, L.; CATALIOTTI, A.; BELLANUOVA, I.; FERMO, I.; FROLICH, J.; BOGER, R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. **Lancet**, v.358, n.9299, Dec 22-29, p.2113-7. 2001.

**ANEXO A - Declaração de recomendação favorável para publicação do Estudo 1 no**  
***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***

Página 1 de 1

**Antonio Marcos Vargas da Silva**

---

**De:** ANTONIO MARCOS VARGAS DA SILVA [amvs@brturbo.com.br] **Enviada:** ter 8/4/2008 18:53  
**Para:** Antonio Marcos Vargas da Silva  
**Cc:**  
**Assunto:** Fwd: MS7039R  
**Anexos:**

----- Forwarded message -----

**From:** **Beatriz Schaan** <beatrizschaan@gmail.com>  
**Date:** 25/03/2008 13:05  
**Subject:** Fwd: MS7039R  
**To:** ANTONIO MARCOS VARGAS DA SILVA amvs@brturbo.com.br

----- Forwarded message -----

**From:** **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** <bjournal@fmrp.usp.br>  
**Date:** 25/03/2008 23:47  
**Subject:** Re: MS7039R  
**To:** Beatriz Schaan <beatrizschaan@gmail.com>

Prezada Dra. Beatriz, no dia 11/3/08 seu trabalho recebeu recomendação favorável para publicação. O texto está com nossas redatoras e editor de estilo preparando a correção de inglês que se for necessário será encaminhado para sua aprovação antes da preparação da prova gráfica.

Brevemente a senhora terá informações.

Cordialmente,

Dalva

**ANEXO B – Comprovante de submissão do Estudo 2 ao *Diabetes Care***

From: <diabetescare@diabetes.org>  
Sender: <onbehalf@scholarone.com>  
To: <bschaan.pesquisa@cardiologia.org.br>,  
<editoracao-pc@cardiologia.org.br>  
Subject: Diabetes Care - Manuscript ID DC-08-0602  
Date: Tue, 25 Mar 2008 10:30:08 -0300  
DC-08-0602 - "Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes" has been submitted to Diabetes Care.

---

Dear Dr. Schaan:

This is to confirm that the paper entitled Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with type 2 diabetes has been successfully submitted to the Editorial Office. The manuscript number is DC-08-0602. As Corresponding Author, you will receive all future communications via e-mail. A paper may not be considered fully submitted until the Manuscript Submission Form (attached) has been signed by all authors and received by the Editorial Office. Please fax the form(s) to 1-317-354-8379.

The new single-page form addresses ADA's policies on 1) originality and authorship, 2) copyright assignment, and 3) potential conflict of interest. Each author should check the appropriate boxes, print his/her name, and sign the document where indicated. Please include only five names to a form. You may attach additional forms if necessary. The manuscript submission form is attached to this e-mail and is available on the submission website.

Besides normal page charges for accepted papers, there is an additional charge of \$630 for each color figure. If you have submitted color images and your article is accepted, a Color Approval Form will be e-mailed to you, with your acceptance notification, and we ask that you sign and return this form by fax to inform us of your agreement to pay for color charges. For more specific information, refer to the online Instructions for Authors at <http://care.diabetesjournals.org>.

If you have references in your paper that are in press, you must provide a copy of the supporting paper for review.

Papers are pre-evaluated for essential features: hypothesis testing, suitable controls, appropriate statistical methods, clear reporting of results, and conclusions supported by the results. Papers are also evaluated on uniqueness and importance. Editors have the option of declining any manuscript, without peer-review, that does not fit within essential features.

It is suggested that you allow an initial six weeks before checking on the status of your manuscript. You may request status by e-mailing [ReviewResponse@diabetes.org](mailto:ReviewResponse@diabetes.org); be sure to include your manuscript ID (DC-08-0602).

We would like to take this opportunity to thank you for your interest in Diabetes Care and for allowing us the privilege of considering your submission.

Sincerely,

Diabetes Care Editorial Office

**ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido – Estudo 1****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem por objetivo avaliar o efeito de algumas medicações já conhecidas dentro dos vasos sanguíneos. Para isto, será puncionada uma veia em cima de sua mão direita, onde será colocado um soro e após injetada algumas medicações. A dose que será feita é muito pequena e o efeito causado por elas será único e exclusivamente no local da punção, não tendo nenhum efeito no restante de seu organismo. Desta forma, você não corre nenhum risco ao recebê-las nestas doses. As medicações irão fazer com que a sua veia fique mais dilatada (aberta, com uso de acetilcolina e nitroprussiato de sódio) ou mais estreita (fechada, com o uso de fenilefrina). Em cima de sua mão será colocado um pequeno aparelho que vai registrar o movimento desta veia quando injetada estas medicações. Este exame irá durar em média duas horas, e você ficará confortavelmente deitado durante todo o procedimento. Este tipo de exame já foi feito muitas vezes em nosso laboratório, sendo extremamente seguro.

Os riscos a que você ficará exposto serão mínimos, incluindo dor tipo “picada de mosquito” na hora da punção e algum hematoma (mancha roxa) que poderá surgir após a retirada da agulha de sua veia. No momento da punção nós iremos retirar aproximadamente 1 e ½ colher de sopa de sangue (aproximadamente 8 ml), para que possamos realizar o teste de glicemia, do perfil lipídico (de colesterol) e de outros componentes do sangue que fazem parte da avaliação inicial. A sua pressão arterial também será continuamente verificada através do aparelho de pressão colocado em uma de suas pernas. Esses exames aos quais o Sr. (a) está sendo submetido, não trarão benefício imediato, mas poderão auxiliar a equipe a entender mais e melhor a resposta dos vasos sanguíneos a determinadas medicações e futuramente utilizar estas informações em seu benefício e de outros pacientes. O Sr. (a) poderá desistir de fazer o exame a qualquer momento, mesmo após ter começado, e isso não vai lhe trazer nenhum prejuízo à continuidade da assistência prestada pela equipe de saúde deste hospital. Todos os resultados destes exames serão guardados sob nosso sigilo, resguardando seu anonimato, assim como nossa ética profissional exige.

Não haverá despesas pessoais para o Sr. (a) em qualquer fase desta pesquisa incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.

Os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Eu, ..... acredito ter sido suficientemente informado a respeito da pesquisa que tem o objetivo de avaliar o efeito de medicações dentro dos vasos sanguíneos.

Eu discuti com o Fisioterapeuta Antônio Marcos Vargas da Silva e com o médico Dr. Elvino Barros sobre minha decisão em participar desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimento permanente. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Poderei entrar em contato com eles no telefone 3316-8295 ou 3227-9115 para qualquer esclarecimento.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido – Estudo 2****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem por objetivo avaliar o efeito de algumas medicações já conhecidas dentro dos vasos sanguíneos.

Para isto, o Sr. (a) irá realizar dois exames conforme relatado a seguir:

No primeiro exame, para avaliar as veias, será puncionada uma veia em cima de sua mão direita, onde será colocado um soro e após injetada, em seqüência, 3 medicações: Fenilefrina, Acetil colina e nitroprussiato. As doses que serão tão pequenas que o efeito causado por elas será único e exclusivamente no local da punção, não tendo nenhum efeito no restante de seu organismo. Desta forma, você não corre nenhum risco ao recebê-las. As medicações irão fazer com que a sua veia fique mais dilatada (aberta, com uso de acetilcolina e nitroprussiato de sódio) ou mais estreita (fechada, com o uso de fenilefrina). Em cima de sua mão será colocado um pequeno aparelho que vai registrar o movimento desta veia quando injetada estas medicações. Este exame irá durar em média duas horas, e você ficará confortavelmente deitado durante todo o procedimento. Os riscos a que você ficará exposto serão mínimos, incluindo dor tipo “picada de mosquito” na hora da punção e algum hematoma (mancha roxa) que poderá surgir após a retirada da agulha de sua veia. No momento da punção nós iremos coletar aproximadamente 12 ml de sangue para que possamos realizar os exames de que fazem parte da avaliação. Sua glicose será medida através de glicosímetro antes e no final do teste.

No segundo exame, para avaliar as artérias, você ficará deitado confortavelmente durante 45 minutos e será colocado no seu braço um manguito de pressão e um aparelho para medir a dilatação da artéria quando esse manguito apertar o braço. Logo após será aplicado um *spray* de nitroglicerina em baixo de sua língua e novamente medida a dilatação da artéria do braço. Estes exames já foram feitos muitas vezes em nosso laboratório, sendo extremamente seguros. A sua pressão arterial também será continuamente verificada através do aparelho de pressão colocado no braço contrário ao do exame.

Os exames aos quais o Sr. (a) está sendo submetido, não trarão benefício imediato a você, mas poderão auxiliar a ciência a entender mais e melhor como as diferentes reações dos vasos sanguíneos podem se relacionar com as complicações do diabetes.

O Sr. (a) poderá desistir de fazer o exame a qualquer momento, mesmo após ter começado, e isso não vai lhe trazer nenhum prejuízo à continuidade da assistência prestada pela equipe de saúde deste hospital. Todos os resultados destes exames serão guardados sob nosso sigilo, resguardando seu anonimato, assim como nossa ética profissional exige.

Não haverá despesas pessoais para o Sr. (a) em qualquer fase desta pesquisa incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação. Será fornecido 1 Vale-transporte e lanche após o procedimento.

Consentimento:

Estou suficientemente informado a respeito da pesquisa que tem o objetivo de avaliar o efeito de medicações na contratilidade dos vasos sanguíneos.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimento permanente. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas.

A responsabilidade do estudo fica a cargo da equipe do Professor Dr. Marcello Bertoluci, à qual poderei entrar em contato através do telefone 2101-8246 diariamente entre 15 e 16h para esclarecimentos.

Eu, ..... concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**ANEXO E - Doses de fenilefrina utilizadas no protocolo de avaliação da função  
endotelial venosa.**

FENILEFRINA  
FRASCO 2%

	<b>STOCK</b>	<b>SORO FISIOLÓGICO</b>	<b>ng/ml</b>	<b>ng/min</b>	<b>Seqüência de infusão</b>
AP	0,5 ML/STOCK	19,5 ml	500.000		
EP	0,1 AP + 0,9 S. FISIOL.	19 ml	2.500	750	6
JP	0,3 EP + 0,7 S.FISIOL.	9 ml	75	25	1
IP	0,6 EP + 0,4 S.FISIOL.	9 ml	150	50	2
HP	1,2 EP + 0,8 S.FISIOL.	8 ml	300	100	3
GP	2,4 EP + 0,6 S.FISIOL.	7 ml	600	200	4
FP	5 EP	5 ml	1.250	416,6	5
DP	0,2 AP + 0,8 S.FISIOL.	19ml	5.000	1.666,6	7
CP	0,4 AP + 0,6 S.FISIOL.	19 ml	10.000	3.333,3	8
BP	1 AP	19 ml	25.000	8.333,3	9

**ANEXO F - Doses de acetilcolina utilizadas no protocolo de avaliação da função  
endotelial venosa.**

ACETILCOLINA  
FRASCO 3 mg

	<b>STOCK</b>	<b>SORO FISIOLÓGICO</b>	<b>ng/ml</b>	<b>ng/min</b>	<b>Seqüência de infusão</b>
MÃE	3 mg	10	300.000		
ACH A	0,4 ml/mãe + 0,6 ml S. FISIOL.	9	12.000	3.600	
ACH B	0,2 ml/mãe + 0,8 ml S.FISIOL	9	6.000	1.800	5
ACH C	2,0 ml A	8	2.400	720	4
ACH D	2,0 ml B	8	1.200	360	3
ACH E	0,2 ml B + 0,8 ml S. FISIOL.	9	120	36	2
ACH F	1,0 ml E	9	12	3,6	1

**ANEXO G - Concentração de fenilefrina diluída nas concentrações de acetilcolina e nitroprussiato de sódio para manter o estado de vasoconstrição (ED70).**

<b>DILUIÇÃO</b>	<b>ng/ml</b>	<b>ml/DILUIÇÃO</b>	<b>ACh/ml e NPS/ml</b>
JP	75	0,25 EP	7
IP	150	0,5 EP	7
HP	300	1,0 EP	7
INTERM	450	1,5 EP	7
GP	600	1,0 DP	7
INTERM	925	1,5 DP	7
FP	1.250	1,0 CP	7
INTERM	1.850	1,5 CP	7
EP	2.500	0,8 BP	7
INTERM	3.750	1,2 BP	7
DP	5.000	1,6 BP	7
INTERM	7.500	2,4 BP	7
CP	10.000	3,2 BP	7
INTERM	18.750	0,3 AP	7
BP	25.000	0,4 AP	7

**ANEXO H - Doses de nitroprussiato de sódio utilizadas no protocolo de avaliação da função endotelial venosa.**

NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS)  
FRASCO 100 mg

	<b>STOCK</b>	<b>SORO GLICOSADO</b>	<b>ng/ml</b>	<b>ng/min</b>	<b>Seqüência de infusão</b>
MÃE	100 mg	4 ml	25		
NPS A	0,1 ml/mãe + 0,9 S.GLIC.	19	125.000	39.625	
NPS B	0,5 ml/A + 0,5 S.GLIC.	19	3125	990,6	2
NPS C	0,25 ml/A + 0,75 S.GLIC.	19	1.562,5	495,3	1

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)