

KELB BOUSQUET SANTOS

**REATIVIDADE VASCULAR E FUNÇÃO ENDOTELIAL
DE INDIVÍDUOS SADIOS SOB RISCO DE DESENVOLVER
DIABETES TIPO 2**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e
Experimental da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro
como requisito parcial na
obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Rio de Janeiro

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Santos, Kelb Bousquet

Reatividade vascular e a função endotelial de indivíduos sadios sob risco de desenvolver diabetes tipo 2 / Kelb Bousquet Santos. Niterói, 2006.

107 p.

Tese (doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Fisiopatologia Clínica e Experimental, 2006.

Descritores: 1. Endotélio 2. Reatividade vascular 3. Hispanos 4. Obesidade 5. História familiar de diabetes tipo 2

KELB BOUSQUET SANTOS

**REATIVIDADE VASCULAR E FUNÇÃO ENDOTELIAL
DE INDIVÍDUOS SADIOS SOB RISCO DE DESENVOLVER DIABETES TIPO 2**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Clínica e
Experimental da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro
como requisito parcial na
obtenção do grau de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Geraldo Mill
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Marília de Brito Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega
Universidade Federal Fluminense

**Rio de Janeiro
2006**

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, em primeiro lugar. Ele esteve de mãos dadas comigo todo o tempo e nos momentos de dificuldade não me deixou fraquejar, renovando diariamente as minhas forças para que eu pudesse completar esta caminhada. Te agradeço hoje e em todos os dias da minha vida por tantas bênçãos.

Ao meu orientador Antonio Claudio, meu grande incentivador e amigo. São nove anos de convivência, estabelecendo uma relação profissional e de amizade com base sólida, que sempre resistirá ao tempo e à distância.

À minha querida família, meu marido Sergio, meus pais Francisco e Lair, minha irmã Francyla e meus sogros Maria e Ramalho. Vocês são meu alicerce, minha eterna fonte de amor, alegria e companheirismo. Obrigada pelo apoio incondicional.

A todos os colegas do Laboratório de Ciências do Exercício, em especial ao Prof. Pedro Paulo Soares pela revisão da tese, à doutoranda e amiga Fabricia Junqueira e à bolsista de iniciação científica Danielle Freitas pela valiosa contribuição na coleta de dados. A realização deste trabalho só foi possível graças à ajuda de vocês duas. Muito obrigada !

Ao Dr. Enrique Caballero do Joslin Diabetes Center que de forma tão gentil me recebeu e permitiu minha ativa participação nos projetos de pesquisa.

Ao Dr. Ney Barreto da Universidade Federal Fluminense que possibilitou a captação de voluntários a partir do ambulatório de diabetes do Hospital Universitário Antonio Pedro.

À Rede Labs Cardiolab, especialmente o Dr. Washington Araújo e Dr. Paulo Costa, que gentilmente realizaram parte das dosagens do estudo.

À Prof^a Isabel Rossi da Universidade Federal do Rio de Janeiro que possibilitou à realização dos experimentos com células progenitoras e ao Prof^o Mauro Granjeiro da Universidade Federal Fluminense que viabilizou a interação com a Prof^a Isabel Rossi e auxiliou na análise dos dados.

Ao Dr. Hugo Tannus e à bióloga Kelly Pereira do Hospital Pró-Cardíaco, sem os quais seria inviável a dosagem dos marcadores de função endotelial de forma tão ágil.

Ao meu co-orientador, Prof^o Eduardo Tibiriçá, por me apoiar na fase de ingresso no doutorado e juntamente com a Dr^a. Marília Brito participar na concepção do estudo em familiares de diabéticos.

Aos voluntários, pela disponibilidade e paciência na realização dos experimentos.

À CAPES pelo apoio durante todo período do doutorado e especialmente durante o doutorado-sanduíche.

SUMÁRIO

<i>Apresentação</i>	1
<i>Capítulo 1: Introdução geral</i>	2
<i>Capítulo 2: Estudo I</i>	10
2.1 Introdução	10
2.2 Objetivo geral	13
2.2.1 Objetivos específicos	13
2.3 Metodologia	14
2.3.1 Amostra	14
2.3.2 Protocolo	15
2.4 Análise estatística	19
2.5 Resultados	20
2.6 Discussão	25
2.7 Conclusões	38
<i>Capítulo 3: Estudo II</i>	39
3.1 Introdução	39
3.2 Objetivo geral.....	44
3.2.1 Objetivos específicos	44
3.3 Metodologia	45
3.3.1 Amostra	45
3.3.2 Protocolo	46
3.4 Análise estatística	51
3.5 Resultados	53
3.6 Discussão	64
3.7 Conclusões	76
<i>Capítulo 4: Considerações finais</i>	77
<i>Referências bibliográficas</i>	82
<i>Anexos</i>	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de resistência insulínica e ativação inflamatória no adipócito	7
Figura 2: Ilustração da avaliação da reatividade vascular com ultra-som de alta resolução	18
Figura 3: Marcadores de função endotelial nos grupos sob risco e controle	23
Figura 4: Percentual de vasodilatação dependente de endotélio nos grupos sob risco e controle	24
Figura 5: Ilustração da avaliação da reatividade vascular com pletismografia de oclusão venosa	49
Figura 6: Resultados dos marcadores de função endotelial dos grupos com história familiar positiva (HF+) e negativa (HF -) de DM2	55
Figura 7: Resultados da avaliação da reatividade vascular dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2	56
Figura 8: Resultado do percentual de células progenitoras circulantes no sangue periférico dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 e representação dos resultados de um voluntário do grupo HF+	58
Figura 9: Resposta à hiperemia reativa nos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC	61
Figura 10: Fisiopatologia das alterações macrovasculares no sobrepeso/obesidade associando novas hipóteses de hiperatividade endotelial	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas e antropométricas dos grupos sob risco e controle	20
Tabela 2: Resultados do perfil glicêmico e lipídico dos grupos sob risco e controle	21
Tabela 3: Variações no diâmetro vascular durante hiperemia reativa e nitroglicerina dos grupos sob risco e controle	22
Tabela 4: Características clínicas e antropométricas dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2	53
Tabela 5: Perfil glicêmico e lipídico dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2	54
Tabela 6: Valores de condutância vascular na hiperemia reativa e preensão manual dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2	57
Tabela 7: Características antropométricas dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC	59
Tabela 8: Perfil glicêmico, lipídico e de marcadores de função endotelial dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC	60
Tabela 9: Resultados de fluxo sanguíneo após preensão manual e área sob a curva dos testes de reatividade vascular em indivíduos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC	62
Tabela 10: Valores de condutância vascular na hiperemia reativa e preensão manual dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC	Área sob a curva
CO	Controle (grupo do estudo I com IMC entre o percentil 25 e 50)
CPCs	Células progenitoras circulantes
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FC	Frequência cardíaca
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF $\oplus$	História familiar positiva de diabetes tipo 2
HF $\ominus$	História familiar negativa de diabetes tipo 2
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAD	Pressão arterial diastólica
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio – 1
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
sICAM	Molécula de adesão intercelular solúvel
SR	Sob risco (grupo do estudo I com IMC acima do percentil 85)
sVCAM	Molécula de adesão celular vascular solúvel
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
tPA	Ativador tecidual de plasminogênio

RESUMO

O endotélio é um importante regulador da homeostase vascular e sua disfunção está relacionada à gênese das doenças cardiovasculares, principal causa de morte em pacientes diabéticos. Hispanos e indivíduos com história familiar de diabetes tipo 2 (DM2) apresentam maior risco de desenvolver a doença. O objetivo geral desta tese foi avaliar a reatividade vascular e a função endotelial em indivíduos sob risco de desenvolver DM2. No primeiro experimento foram realizados testes bioquímicos, avaliação de composição corporal (DEXA) e da reatividade vascular (ultra-som de alta resolução da artéria braquial) em crianças e adolescentes hispanas obesas (grupo sob risco - SR; $n = 19$; 10 meninas; 13 ± 3 anos) em comparação ao grupo controle magro (grupo CO; $n = 17$; 9 meninas; 14 ± 2 anos). O grupo SR apresentou maiores níveis de insulina e triglicerídeos, além de maior concentração de marcadores de ativação endotelial (proteína C-reativa, interleucina-6, fator de necrose tumoral-alfa e molécula de adesão intercelular solúvel) em comparação ao grupo CO ($P < 0,05$). O percentual de vasodilatação dependente de endotélio foi maior no grupo SR (SR = $8,2 \pm 2,8\%$; CO = $5,6 \pm 4,0\%$; $P < 0,01$). No segundo experimento foram avaliados indivíduos com história familiar de DM2 (HF $\oplus$; $n = 34$; 28 mulheres, 33 ± 9 anos) pareados para sexo, idade e peso com um grupo controle sem história familiar de DM2 (HF $\ominus$; $n = 31$, 23 mulheres, 33 ± 9 anos). Não foram encontradas diferenças entre os grupos no perfil lipídico ou glicêmico, reatividade vascular (avaliada por pletismografia de oclusão venosa) ou marcadores de função endotelial (adiponectina, molécula de adesão celular solúvel, proteína C-reativa, leptina ou número de células progenitoras circulantes) ($P > 0,05$). Posteriormente os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ foram estratificados quanto ao índice de massa corpórea. Observou-se maiores níveis de LDL e leptina nos grupos com sobrepeso (HF $\oplus$ e HF $\ominus$) enquanto a glicemia de jejum foi superior no grupo HF $\oplus$ sobrepeso ($P < 0,05$ vs HF $\oplus$ magro). A vasodilatação dependente de endotélio foi superior nos grupos com sobrepeso em comparação aos magros. Concluindo, voluntários sadios com história familiar de DM2 apresentaram reatividade vascular e níveis de marcadores de função endotelial semelhantes a voluntários sem história familiar da doença. A resposta vasodilatadora dependente de endotélio foi maior em indivíduos com sobrepeso. Resultado semelhante foi encontrado em crianças e adolescentes hispanas obesas. Estes achados sugerem que possa haver uma fase de hiperatividade endotelial, que precede sua disfunção na obesidade, como parte de um mecanismo compensatório para manutenção da homeostase vascular. A leptina e a insulina parecem ser mediadores desta resposta vasodilatadora aumentada.

Palavras-chave: endotélio, obesidade, hispanos, história familiar de diabetes tipo 2.

ABSTRACT

The endothelium is an important regulator of vascular homeostasis and endothelial dysfunction is related to the genesis of cardiovascular disease, the main cause of death in patients with diabetes. Hispanics and relatives of patients with type 2 diabetes (DM2) present higher risk to develop this disease. The general aim of this thesis was to evaluate vascular reactivity and endothelial function in individuals at risk for DM2. At the first experiment, biochemical tests, body composition evaluation (DEXA) and vascular reactivity evaluation (brachial artery high resolution ultrasound) were conducted in obese hispanic children and adolescents (at risk group – AR; $n = 19$; 10 girls; 13 ± 3 years old) in comparison with a lean control group (CO group; $n = 17$; 9 girls; 14 ± 2 years old). The AR group presented higher levels of insulin and triglycerides, besides higher concentration of endothelial activation markers (C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule) compared to CO group ($P < 0,05$). Percent of endothelium-dependent vasodilation was higher in the AR group (AR = $8,2 \pm 2,8\%$; CO = $5,6 \pm 4,0\%$; $P < 0,01$). At the second experiment, subjects with family history of DM2 were evaluated (FH $\oplus$; $n = 34$; 28 women, 33 ± 9 years old) paired with a sex, age and weight control group without family history of DM2 (FH $\ominus$; $n = 31$, 23 women, 33 ± 9 years). There were no differences between groups in the results of the lipid or glycemic profile, vascular reactivity (evaluated by venous occlusion plethysmography) or markers of endothelial function (adiponectin, soluble cellular adhesion molecule, C-reactive protein, leptin or number of circulating progenitor cells) ($P > 0,05$). Later, FH $\oplus$ and FH $\ominus$ groups were stratified by body mass index. Higher levels of LDL and leptin were observed at the overweight groups (FH $\oplus$ e FH $\ominus$) while the fasting glucose was higher at the overweight FH $\oplus$ group ($P < 0,05$ vs lean FH $\oplus$). Endothelium-dependent vasodilation was higher at the overweight groups in comparison with the lean groups. In conclusion, healthy volunteers with family history of DM2 presented vascular reactivity and levels of markers of endothelial function similar to volunteers without family history of the disease. The endothelium-dependent vasodilatory response was higher in overweight individuals. Similar results were found in obese hispanic children and adolescents. These findings suggest that there may be a phase of endothelial hyperactivity, which precedes its dysfunction at obesity, as part of a compensatory mechanism for maintenance of vascular homeostasis. Leptin and insulin seems to be mediators of this augmented vasodilator response.

Key words: endothelium, obesity, hispanics, family history of type 2 diabetes.

“Um homem nunca sabe
aquilo de que é capaz
até que o tenta fazer”
Charles Dickens

APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados de dois estudos realizados durante o período de doutoramento. O primeiro experimento investigou a função endotelial e a reatividade vascular de crianças e adolescentes hispano-americanas obesas e é fruto das atividades realizadas durante o doutorado-sanduíche em 2003 no *Joslin Diabetes Center*, hospital afiliado à *Harvard Medical School*, sob orientação do Dr. Enrique Caballero. Além de participar da execução deste projeto de pesquisa, tive a oportunidade de aprender a técnica de avaliação da reatividade vascular com ultra-som de alta resolução e posteriormente implementar esta metodologia no Programa de Pós-Graduação em Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal Fluminense, com o qual nosso laboratório tem colaboração.

O segundo experimento desta tese teve como objetivo investigar a reatividade vascular e a função endotelial de indivíduos com história familiar de diabetes tipo 2 e foi realizado no Laboratório de Ciências do Exercício da Universidade Federal Fluminense, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega. No primeiro semestre de 2004 implantamos a técnica de pletismografia de oclusão venosa em nosso laboratório, com publicação dos resultados dos experimentos iniciais em revista indexada. A partir de então, foi possível ampliar os projetos de pesquisa dentro desta linha de investigação relacionando reatividade vascular e história familiar de diabetes tipo 2, com captação de verba para execução dos mesmos e formação de recursos humanos.

Sendo assim, esta tese está organizada no formato de uma introdução geral, onde serão abordados os aspectos relacionados à fisiopatologia da função endotelial e da reatividade vascular em população hispano-americana assim como em indivíduos com história familiar de diabetes tipo 2, seguido dos dois estudos e seus respectivos itens (introdução, metodologia, resultados, discussão e conclusão) e concluindo com as considerações finais.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

A descoberta de Furchgott e Zawadzki ¹ em 1980 de que a vasodilatação em resposta à acetilcolina em preparações de anéis de aorta era dependente da presença de células endoteliais íntegras revolucionou o estudo da fisiopatologia cardiovascular. Atualmente o endotélio é considerado um órgão endócrino ativo, que em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos, sintetiza e libera substâncias vasoativas que modulam o tônus vascular. Além desta função, o endotélio é um importante componente na regulação da coagulação, trombólise, remodelamento vascular e resposta inflamatória ².

As células endoteliais se originam do mesmo tecido embrionário das células sanguíneas, o hemangioblasto, e recobrem todos os vasos sanguíneos do organismo ³. A membrana luminal destas células possui invaginações denominadas cavéolas, que possuem uma ampla variedade de receptores, como o receptor muscarínico, receptor do estrógeno do tipo alfa e receptor da insulina, além de moléculas sinalizadoras e efetoras relacionadas à estimulação e produção de substâncias pelo endotélio. Ao estar exposta aos componentes e constituintes do sangue, a membrana luminal das células endoteliais atua como um sensor biológico, capaz de detectar variações de pressão, fluxo sanguíneo, mediadores químicos e alterações metabólicas que possam ocorrer em qualquer local do organismo. Estas informações são processadas e transmitidas a outras células endoteliais através de junções intercelulares, gerando uma resposta local ou sistêmica, dependendo da repercussão da agressão ³. Alguns estímulos como a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular, a tensão de cisalhamento (*shear stress*) e modificações no ambiente químico local (como hipóxia tecidual) promovem a liberação de substâncias vasodilatadoras pelo endotélio, especialmente o óxido nítrico (NO). O NO sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por ação da óxido nítrico sintetase (NOS) ativa a monofosfato guanilato ciclase, a qual diminui as concentrações de cálcio intracelular e provoca o relaxamento da musculatura lisa

vascular ³. Além do NO, outras substâncias vasodilatadoras secretadas pelo endotélio incluem o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina ³. A manutenção do tônus vascular normal é dependente de fatores miogênicos, do sistema nervoso autônomo, de metabólitos locais e do equilíbrio entre a síntese de substâncias vasodilatadoras, principalmente o NO, em relação a substâncias vasoconstritoras derivadas do endotélio ⁴. Dentre os vasoconstritores secretados pelas células endoteliais destaca-se a endotelina, a angiotensina II e o tromboxano A2 ⁴.

O NO não apenas modula o tônus da musculatura lisa do vaso, mas também inibe diversos processos pró-aterogênicos ³. Muitos dos efeitos protetores do endotélio são mediados pelo NO, o qual limita o recrutamento de leucócitos ao inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão leucocitárias, inibe a proliferação de músculo liso vascular, a adesão e agregação de plaquetas ⁵. A atividade biológica do NO depende da concentração de oxigênio presente no meio, sendo a manutenção do equilíbrio oxidativo do organismo fundamental para o desempenho de suas funções. A maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) associado à uma baixa disponibilidade de L-arginina ou tetrahydrobiopterina (substrato e co-fator da produção de NO) e/ou de superóxido dismutase, catalase e glutadiona peroxidase (responsáveis pelo controle biológico da produção de ROS) pode causar dano vascular principalmente devido à perda do efeito modulador do NO ³. O desequilíbrio entre maior produção de ROS e/ou menor atividade de substâncias antioxidantes presentes no organismo, ao promover o estresse oxidativo e conseqüentemente diminuir a disponibilidade de NO, está relacionado à fisiopatologia de doenças como diabetes, hipertensão arterial e aterosclerose ³. Um exemplo são os efeitos da hiperglicemia, que diretamente aumenta a produção de radicais livres e indiretamente promove uma redução da biodisponibilidade de NO ao causar um acúmulo de produtos finais de glicação avançada e uma deficiência de tetrahydrobiopterina associada à resistência insulínica ^{6, 7}.

Agressões químicas, mecânicas ou metabólicas ao vaso podem levar à disfunção da célula endotelial, fazendo com que o endotélio se torne um “substrato” para o acúmulo de

diversos tipos de células ⁴. A resposta vascular a estes agentes agressores é do tipo inflamatória e envolve a interação de diversos grupos celulares como monócitos, linfócitos T, plaquetas e células musculares lisas vasculares, dando início a uma série de eventos que culminam com a formação da placa aterosclerótica ⁴. A disfunção endotelial representa a primeira fase na formação da placa ateromatosa, onde a deposição de leucócitos sobre o endotélio e sua penetração no espaço subendotelial é mediada por moléculas de adesão expressas no endotélio e nas células circulantes ⁸. Acredita-se que a secreção de moléculas de adesão seja regulada por citocinas sintetizadas em pequenas quantidades pelo endotélio (interleucina-6, fator de necrose tumoral - alfa, interleucina - 1), que na vigência de disfunção endotelial tem suas concentrações aumentadas, estimulando a produção de moléculas de adesão e favorecendo o recrutamento e a adesão de monócitos à superfície endotelial ⁸.

Atualmente diferentes metodologias são utilizadas na investigação da função endotelial e abrange desde métodos celulares e moleculares até a pesquisa aplicada a seres humanos, utilizando métodos invasivos e não-invasivos e determinação de substâncias no plasma que indiquem ativação e lesão endotelial ⁹. Estes métodos ganharam importância não apenas por possibilitar a investigação da fisiopatologia da disfunção endotelial, mas também por representar um marcador de risco precoce para eventos cardiovasculares ¹⁰. Dentre os marcadores plasmáticos utilizados na avaliação da função endotelial estão as moléculas de adesão celular, proteína C reativa (PCR), endotelina e células progenitoras endoteliais ¹¹⁻¹³. A pletismografia de oclusão venosa é uma técnica que quantifica as variações de volume em um determinado segmento corporal ⁹. Pode ser utilizada como um método invasivo ao se administrar acetilcolina e nitroprussiato de sódio na artéria braquial para obter respectivamente uma resposta vasodilatadora dependente e independente de endotélio ou usar uma metodologia não invasiva onde se avalia a variação do volume do antebraço durante a hiperemia reativa, exercício manual ou ainda durante o estresse mental. Para o estímulo da hiperemia reativa a circulação do braço é temporariamente ocluída utilizando-se um manguito inflado a uma pressão supra-sistólica. O estresse de cisalhamento após a oclusão aumenta a produção de óxido nítrico que

juntamente com os metabólitos liberados localmente causam vasodilatação ¹⁴. Na apreensão manual, a avaliação da resposta vasodilatadora pode ser feita durante ou imediatamente após a realização do exercício; os mecanorreceptores e metaborreceptores são importantes mediadores da vasodilatação neste tipo de estímulo ¹⁵. A hiperemia reativa pós-oclusiva também é utilizada em outra técnica não-invasiva, o ultra-som de alta resolução, onde se avalia as variações no diâmetro da artéria braquial. Nesta técnica, habitualmente se faz a administração de nitroglicerina sublingual alguns minutos após a realização da hiperemia reativa. Como os nitratos agem diretamente na musculatura lisa vascular, este estímulo promove uma vasodilatação independente de endotélio ¹⁶.

A obesidade e o diabetes são dois importantes fatores de risco para disfunção endotelial ¹⁷. As complicações cardiovasculares são a principal causa de morte em pacientes com diabetes tipo 2 (DM2) ¹⁸. Nos Estados Unidos cerca de 7% dos óbitos por doença cardiovascular em indivíduos entre 30 e 75 anos são causadas pelo diabetes ¹⁸. Um estudo confirmou estes achados em população brasileira, onde 36,4% dos pacientes diabéticos morreram em decorrência de doença cardiovascular ¹⁹. 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 ²⁰. O diabetes do tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida ²⁰. O DM2 é caracterizado por um quadro de resistência à insulina que pode estar associado a uma deficiência na produção deste hormônio ²¹. Cerca de 170 milhões de pessoas em todo mundo tem diabetes, dos quais 90-95% são acometidas com DM2. Estima-se que o número total de diabéticos em 2030 deverá ser de 300 milhões, o que representa um aumento de 114%; a Índia, China e os Estados Unidos ocupam respectivamente as três primeiras posições na lista de países com maior número de casos de diabetes enquanto o Brasil é o sexto colocado ²². O sedentarismo e a obesidade são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DM2, um reflexo da mudança de hábitos da vida moderna. Mais de um bilhão de adultos em todo mundo tem sobrepeso, dos quais 300 milhões são obesos ²³. A

obesidade na infância e adolescência já é considerada uma epidemia em alguns países. Em crianças e adolescentes americanas foi observado um aumento de 45% na prevalência de sobrepeso e obesidade entre 1999 e 2002, sendo a população hispana a mais acometida ²⁴.

A hiperplasia e a hipertrofia das células adiposas na obesidade está associada com importantes alterações metabólicas e vasculares ²⁵. Os adipócitos secretam uma série de citocinas, dentre elas a PCR, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e leptina que, em níveis elevados, dão início a um processo inflamatório generalizado. A adiponectina, única adipocitocina com atividade anti-aterogênica e anti-inflamatória, tem seus níveis reduzidos na obesidade. Estas alterações na secreção de adipocitocinas em indivíduos obesos são capazes de promover resistência insulínica e disfunção endotelial ²⁶. O processo inflamatório mediado pelos adipócitos pode ser iniciado a partir de mediadores extracelulares, como citocinas e lipídios, ou por vias intra-celulares, em razão de uma maior demanda do retículo endoplasmático do adipócito ou maior produção de ROS pela mitocôndria devido ao metabolismo glicídico aumentado ²⁶. Sinais de todos estes mediadores convergem em vias de sinalização inflamatória que levam à produção de outros mediadores inflamatórios e inibição direta da sinalização da insulina (figura 1). A maior secreção de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo também contribui para o quadro de resistência à insulina ao diminuir sua ação no fígado e músculo esquelético através de mecanismos que afetam a cascata de sinalização intracelular deste hormônio. Quanto aos efeitos vasculares das adipocitocinas, estudos *in vitro* demonstraram que a leptina promove a formação de ROS além de estimular a secreção de outras citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF-alfa ¹⁷. A PCR induz a expressão de moléculas de adesão produzidas pelo endotélio, promove inibição da NOS e da sinalização do NO ^{27, 28} e estimula secreção de IL-6 e endotelina-1 ²⁹. Enquanto alguns autores sugerem que a disfunção endotelial promove resistência insulínica, outros afirmam que o aumento do estresse oxidativo provocado pela resistência à insulina seja diretamente responsável pela disfunção endotelial ^{30, 31}.

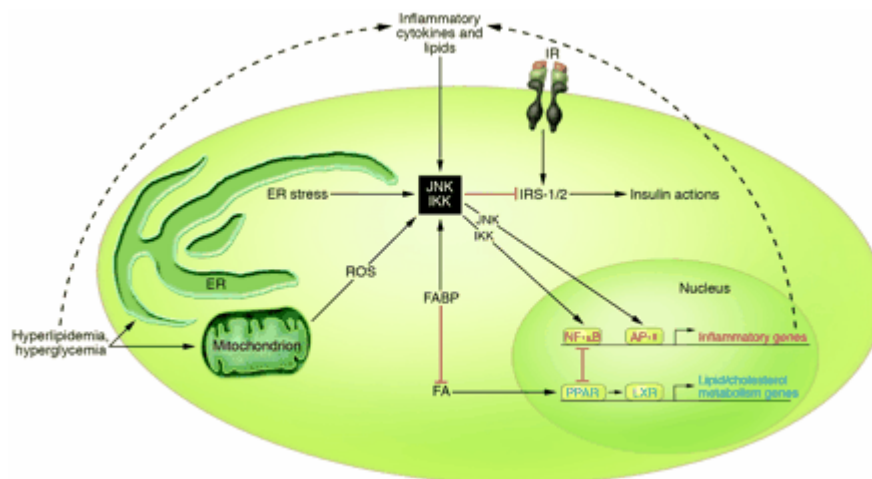


Figura 1: Mecanismos de resistência insulínica e ativação inflamatória no adipócito. ER: retículo endoplasmático; FA: ácidos graxos; FAFB: proteínas ligadoras de ácidos graxos; JNK e IKK: proteínas quinases inflamatórias. Adaptado de Wellen e cols ²⁶.

O risco de desenvolver DM2 aumenta com o grau e a duração do sobrepeso e com uma distribuição mais central da gordura ²⁰. Nos estágios iniciais da doença, a tolerância à glicose permanece normal apesar da resistência insulínica porque as células beta pancreáticas a compensam através do aumento da secreção de insulina. À medida que a resistência insulínica e a hiperinsulinemia compensatória avançam, as ilhotas pancreáticas tornam-se incapazes de sustentar o estado hiperinsulinêmico. Então sobrevêm a tolerância reduzida à glicose, caracterizada por elevações na glicose pós-prandial. Um declínio subsequente da secreção de insulina e um aumento da produção hepática de glicose levam ao diabetes franco com hiperglicemia de jejum. Por fim, pode sobrevir a insuficiência das células beta ³². No aspecto vascular, a alteração da função endotelial se intensifica pela hiperglicemia, hiperinsulinemia e pela resistência insulínica culminando com a diminuição na síntese de NO. Além disso, há maior secreção de substâncias vasoconstritoras e pró-inflamatórias, promovendo agregação plaquetária, adesão e migração de leucócitos para a camada sub-endotelial, proliferação de músculo liso vascular e outros eventos na cadeia de formação da placa aterosclerótica ¹⁷. Como as alterações na função endotelial causadas por esta desordem metabólica progridem de forma assintomática e precedem em muitos anos o

diagnóstico do DM2, no momento em que a doença é diagnosticada, o paciente pode apresentar um comprometimento vascular em estágio avançado ²⁰. Sendo assim, a investigação da função endotelial tem sido fundamental não apenas para a completa compreensão do mecanismo de gênese da doença cardiovascular em diabéticos e indivíduos sob risco de desenvolvimento da doença, como também no estudo de medidas de prevenção e restauração da função endotelial.

A classe de indivíduos considerados sob risco de desenvolver DM2 inclui aqueles com intolerância à glicose (jejum e/ou pós-prandial), hipertensão, dislipidemia e histórico familiar de DM2 ³³. Determinados grupos étnicos como hispano-americanos e afro-americanos também apresentam maior risco para desenvolver a doença ^{34, 35}. A presença de obesidade e um maior grau de resistência insulínica, características comuns entre estes indivíduos sob risco, representam fatores capazes de promover alteração da função endotelial ³⁶. Os mecanismos de disfunção endotelial neste grupo são complexos e ainda não completamente esclarecidos, especialmente no que se refere à história familiar de DM2 (HF $\oplus$) e diferenças étnicas. A avaliação da reatividade vascular em parentes de primeiro grau de pacientes com DM2 demonstrou que, quando divididos em sub-grupos de acordo com a sensibilidade à insulina, parentes com resistência à insulina apresentam menor vasodilatação dependente de endotélio em comparação a um grupo controle sem história familiar de DM2 (HF $\ominus$) ³⁷. Os autores sugerem que na ausência de resistência insulínica, o histórico familiar de DM2 não deve ser superestimado no que se refere à disfunção endotelial. Estudos controlados, onde as características que possam influenciar na reatividade vascular sejam semelhantes entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ são necessários para o esclarecer se indivíduos com história familiar apresentam alteração da reatividade vascular independente de alterações metabólicas.

No aspecto etnia e risco de DM2, sabe-se que a população hispana infanto-juvenil e adulta apresenta maior prevalência de fatores de risco para doença cardiovascular, incluindo DM2, obesidade e sedentarismo em comparação à população branca ³⁴⁻³⁶. Crianças e adolescentes hispanos apresentam uma resposta compensatória à resistência insulínica que

difere de outros grupos étnicos ³⁸. Apesar de alguns estudos demonstrarem alterações metabólicas em população hispana jovem com sobrepeso, até o momento não há registros que caracterizem a reatividade vascular neste grupo de indivíduos. Uma menor vasodilatação endotélio-dependente tem sido encontrada em crianças e adolescentes brancas obesas em relação às magras, sugerindo que os primeiros estágios no desenvolvimento da doença cardiovascular podem ocorrer ainda na primeira década de vida ^{39, 40}. No entanto, não se sabe se as diferenças observadas no perfil metabólico de crianças e adolescentes hispanas obesas seria capaz de promover uma resposta diferenciada da reatividade vascular em comparação aos achados da literatura em população branca.

Neste contexto, os objetivos gerais desta tese são avaliar a função endotelial e a reatividade vascular de (1) crianças e adolescentes hispanas obesas e (2) indivíduos com histórico familiar de DM2.

CAPÍTULO 2

ESTUDO I: REATIVIDADE VASCULAR E FUNÇÃO ENDOTELIAL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES HISPANO-AMERICANAS SOB RISCO DE DIABETES TIPO 2

2.1 INTRODUÇÃO

Os hispanos representam atualmente o maior grupo minoritário nos Estados Unidos com uma população de aproximadamente 35 milhões de pessoas ⁴¹. Esta estatística é semelhante para a população menor de 18 anos, onde 16% das crianças e adolescentes nos Estados Unidos são hispânicas ⁴¹. Diversos estudos já demonstraram que a população hispana possui maior prevalência de fatores de risco cardiovasculares, incluindo DM2, obesidade, dislipidemia e sedentarismo em comparação à população branca ^{34-36, 42}. Apesar de haver proporcionalmente uma maior prevalência de diabetes na faixa etária de 45 a 64 anos, é preocupante o número crescente de casos na população jovem ⁴³. O diabetes tipo 1 é a doença crônica mais comum na infância; no entanto, o aumento na prevalência de DM2 em crianças e adolescentes pode fazer com que este quadro seja revertido na próxima década ⁴⁴. Um aumento de 10 vezes na incidência de DM2 foi observado em crianças e adolescentes, particularmente nas hispano-americanas e afro-americanas, no período de 1982 a 1994 ^{45, 46}.

A gênese da doença cardiovascular, principal causa de morte em pacientes com DM2, ocorre a partir do desequilíbrio das funções endoteliais, com maior secreção de substâncias vasoconstritoras, pró-inflamatórias e pró-trombóticas ⁴. O endotélio atua na modulação do tônus vascular, regula o processo inflamatório, a ativação plaquetária e a trombose ². Qualquer agressão ao endotélio deve ser considerada relevante e apesar de ser

muitas vezes imperceptível na fase inicial pode causar posteriormente disfunção endotelial ³. A lesão endotelial relacionada à hiperglicemia, dislipidemia e resistência insulínica é silenciosa e progressiva, dando origem às complicações micro e macrovasculares observadas no DM2 ³.

O crescimento acelerado do número de indivíduos obesos nas últimas décadas tem causado grande preocupação, já que a obesidade representa um importante fator de risco para o desenvolvimento do DM2 e doenças cardiovasculares ⁴⁷. Na população infanto-juvenil os números da epidemia de obesidade aumentaram exponencialmente. Nos Estados Unidos, 16% das crianças e adolescentes tem sobrepeso, com maior prevalência em hispanos ²⁴. Assim como na população adulta, a obesidade acelera o processo aterosclerótico em adolescentes e pode contribuir para o aumento na incidência de doença cardiovascular na fase adulta. Fagot-Campagna ⁴⁸ encontraram uma maior prevalência de complicações micro e macrovasculares em adultos jovens que desenvolveram DM2 durante a infância. Considerando que alterações fisiológicas importantes podem ter início na primeira década de vida ⁴⁹, a investigação da reatividade vascular em crianças e adolescentes sob risco de desenvolver DM2 é importante para a compreensão dos mecanismos de gênese da doença cardiovascular nesta população. Alguns estudos sugerem que índices de resistência insulínica estejam correlacionados com uma menor resposta vasodilatadora dependente e independente de endotélio em crianças obesas caucasianas ⁵⁰. O desenvolvimento da resistência à insulina em decorrência da obesidade parece ter influência étnica, onde adolescentes hispânicos apresentam uma resposta compensatória diferenciada com secreção elevada deste hormônio ⁵¹. Outras alterações metabólicas descritas em crianças e adolescentes hispanos obesos incluem maior grau de resistência à insulina e menor tolerância à glicose ³⁸, mas os efeitos de tais alterações sobre a reatividade vascular e a função endotelial não são conhecidos.

A disfunção endotelial em crianças com diabetes tipo 1 já é bem estabelecida ⁵²⁻⁵⁴. No entanto, poucos estudos investigaram o desenvolvimento da disfunção endotelial em crianças e adolescentes com DM 2 ou sob risco de desenvolver a doença pelo fato de

serem obesos ou pertencerem a uma população de risco. A avaliação desta população em relação a anormalidades metabólicas e vasculares poderia identificar um estágio para prevenção do desenvolvimento de DM2 e da doença cardiovascular, por exemplo, através da prática regular de atividade física.

2.2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a reatividade vascular e a função endotelial de crianças e adolescentes hispano-americanos obesos.

2.2.1 Objetivos Específicos

- Comparar a resposta vasodilatadora dependente e independente de endotélio entre crianças e adolescentes magros e obesos de origem hispana;
- Analisar os marcadores de função endotelial em crianças e adolescentes hispano-americanos obesos e magros;
- Analisar as diferenças no perfil glicêmico e lipídico entre crianças e adolescentes obesos e magros de origem hispana;
- Avaliar a composição corporal de crianças e adolescentes obesos de origem hispana em comparação a crianças e adolescentes magros do mesmo grupo étnico.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Amostra

Foram selecionadas crianças e adolescentes hispano-americanos, de ambos os sexos, na faixa etária de 10 a 18 anos. A origem hispana foi considerada quando as crianças e adolescentes e seus pais fossem nascidos em países hispânicos. No caso de voluntários nascidos nos Estados Unidos da América, o pai e mãe deveriam ser originários de países hispânicos. De acordo com o peso corporal, os voluntários foram classificados em um dos seguintes grupos de acordo com o índice de massa corpórea (IMC):

- Grupo sob risco: IMC maior que o percentil 85 para idade e sexo ⁵⁵;
- Grupo controle: IMC entre o percentil 25 e 50 para idade e sexo ⁵⁵.

Os critérios de exclusão foram:

- valores de glicemia de jejum e após sobrecarga de glicose ≥ 126 e/ou ≥ 200 respectivamente ²¹;
- valores de triglicerídeos > 200 mg/dL ou colesterol total ≥ 240 mg/dL ⁵⁶;
- tabagistas ou ex-tabagistas;
- portadores de doenças cardiovasculares, hipertensão (pressão arterial acima do percentil 95 para idade) ⁵⁷, doença renal crônica ou qualquer outra doença crônica que necessite de tratamento ativo;
- uso regular de medicação;
- gravidez;
- ciclos menstruais irregulares;
- praticantes de atividade física regular ou adeptos de programa de condicionamento físico.

2.3.2 Protocolo

O recrutamento dos voluntários foi feito através do contato com os pacientes atendidos no ambulatório de diabetes para pessoas de origem latina no *Joslin Diabetes Center* (Boston, MA), em escolas e centros comunitários na área metropolitana da cidade de Boston e através de anúncios em jornais. Apenas um voluntário de cada família pode participar do estudo.

A avaliação completa incluiu duas visitas no período da manhã ao Centro de Pesquisa Clínica. Os indivíduos realizaram um jejum de 12 horas e abstinência de álcool e atividade física nas 24 horas anteriores a cada visita. Para diminuir a influência das variações hormonais sobre as variáveis vasculares e metabólicas do estudo, todas as meninas foram avaliadas durante a fase folicular (após o término da menstruação, até o 12º dia do ciclo).

Os voluntários selecionados para participarem do projeto e seus responsáveis foram esclarecidos quanto aos procedimentos a serem adotados no estudo, previamente aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (CHS#01-14) e os responsáveis pelos voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Visita 1

a) Exame físico completo e história médica.

Ilustrações com os estágios de desenvolvimento puberal (escala de *Tanner*)⁵⁸ foram mostradas ao voluntário e a seu respectivo responsável para que informassem o estágio no qual a criança ou adolescente se encontrava.

A pressão arterial (sistólica – PAS e diastólica – PAD) foi aferida após cerca de 15 minutos de repouso com esfigmomanômetro manual (Tycos/Welch Allyn, NY, EUA) e utilizando uma braçadeira de dimensões adequadas à estrutura de cada voluntário.

b) Medidas antropométricas

Peso, altura (Demetech Corp, Miami, EUA) e medidas de circunferência da cintura e quadril utilizando fita metálica. Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo avaliador.

c) Coleta de sangue e teste oral de tolerância à glicose (TOTG).

Uma amostra inicial de sangue (15 mL) foi coletada para realização das seguintes dosagens: glicose plasmática, colesterol total e triglicerídeos (Analisador Synchron CX; Beckman Systems, Oxford, CT - EUA), lipoproteína de alta densidade (HDL; Polymedco Inc; Cortlandt Manor, NY - EUA) e lipoproteína de baixa densidade (LDL; calculado através da fórmula de Friedewald ⁵⁹), hemoglobina glicada (HbA1c; cromatografia líquida de alta performance - HPLC) e insulina plasmática (quimioluminescência; Sistema Immulite, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

Parte do volume desta amostra inicial foi imediatamente congelado e mantido a -70°C para posteriormente realizar a dosagem dos seguintes marcadores plasmáticos de ativação endotelial: ácidos graxos livres (método enzimático-colorimétrico, NEFA C kit, Waco Chemicals Inc, Richmond, VA - EUA), PCR (análise enzimo-imunométrica por quimioluminescência em fase sólida, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA), adiponectina (ELISA, Linco Research Inc, St Charles, MI - EUA), inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e ativador tecidual de plasminogênio (tPA; ELISA, Diagnostica Stago Inc, Parsippany, NJ - EUA), molécula de adesão celular vascular solúvel (sVCAM), molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM), TNF-alfa e IL-6 (ELISA, R & D Systems Inc, Minneapolis, MN - EUA).

Em seguida foi realizado o TOTG. As medidas de glicose e insulina foram realizadas nos minutos -10, -5, 0, 30, 60, 90 e 120 após a administração oral de 1,75 g de glicose/kg (máximo de 75 g). Um cateter foi posicionado na veia para facilitar a coleta do sangue até o final do teste. Utilizando os valores de glicose e insulina obtidos no TOTG foram calculadas as respectivas áreas sob a curva e a resistência à insulina utilizando o modelo matemático do HOMA (insulina jejum x glicose jejum/22,5) ⁶⁰.

Visita 2

a) Composição Corporal

Foi utilizada a densitometria com emissão de raios-X de dupla energia (DEXA; Hologic QDR 4500 - Hologic, Bedford, MA). Este método diferencia o peso corporal em componentes de tecido magro, tecido adiposo e tecido ósseo, o que permite distinguir parâmetros regionais e totais de composição corporal ⁶¹.

b) Avaliação da reatividade macrovascular

Realizada em sala com temperatura controlada (24°C) após 15 minutos de aclimação. Foi utilizada a metodologia de ultra-som de alta resolução da artéria braquial (Power Vision 8000 – Toshiba, EUA) utilizando um transdutor linear de 10,0 MHz. Inicialmente foi obtida uma imagem longitudinal basal da artéria braquial, 2 -10 cm acima do cotovelo (figura 2). O centro do vaso foi identificado através da imagem mais clara entre a parede anterior e posterior do vaso. A profundidade e o ganho foram otimizados para identificar a luz e a parede do vaso.

A *vasodilatação dependente de endotélio* foi avaliada através da hiperemia reativa pós-oclusiva. Um manguito posicionado distalmente ao local de obtenção das imagens foi inflado a 50 mmHg acima da pressão sistólica durante 5 minutos e posteriormente desinflado. As imagens da artéria foram gravadas continuamente durante o intervalo 45 a 90 segundos pós-oclusão.

Cerca de 10-15 minutos após a manobra de hiperemia reativa foi realizado um novo registro de repouso para assegurar a completa restauração do diâmetro da artéria braquial. Para a avaliação da *vasodilatação independente de endotélio* foram administrados 400 µg de nitroglicerina spray sublingual. Uma nova imagem da artéria braquial foi obtida no intervalo de 3-4 minutos após a administração da droga. A pressão arterial dos voluntários foi monitorada durante e após a administração da nitroglicerina.

As medidas de reatividade vascular, com a análise das variações no diâmetro da artéria braquial durante a hiperemia reativa e após a administração de nitroglicerina, foram realizadas posteriormente utilizando um programa de computador (Brachial Analyzer DICOM - Medical Imaging Applications, Iowa, EUA). A determinação do diâmetro do vaso foi feita entre as camadas médias da parede anterior e posterior, em sincronia com a onda R do eletrocardiograma. A variação máxima de diâmetro foi obtida para a vasodilatação dependente e independente de endotélio. Posteriormente foi calculado o percentual de mudança do diâmetro da artéria braquial após cada estímulo em relação ao diâmetro basal, assim como a área sob a curva (AUC) durante a hiperemia reativa. O avaliador não tinha conhecimento do grupo ao qual pertencia cada voluntário.



Figura 2: Ilustração da avaliação da reatividade vascular com ultra-som de alta resolução.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho apropriado da amostra de 10 indivíduos para cada grupo foi calculado utilizando uma diferença na média de 20% na função endotelial macrovascular, o desvio-padrão igual a 14%, ambos obtidos em experimentos anteriores⁵⁰ e ajustando-se o poder do teste estatístico para 0,8 e o erro alfa para 0,05.

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi aplicado inicialmente para verificar se as variáveis contínuas tinham distribuição normal. Para comparações entre os grupos o teste-t de *Student* foi aplicado. Para dados que não apresentassem distribuição normal foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Variáveis descontínuas foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado. O coeficiente de correlação produto-momento de Pearson, ou correlação de Spearman no caso de distribuições não normais, foi aplicado para se determinar a associação entre variáveis.

Valores de *P* menor que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O pacote estatístico GraphPad Prism 4 (GraphPad - San Diego, Califórnia, EUA) foi usado na análise estatística.

2.5 RESULTADOS

Trinta e seis crianças e adolescentes hispano-americanas completaram o protocolo do estudo. As características clínicas e antropométricas dos grupos sob risco (SR) e controle (CO) são apresentadas na tabela 1. No grupo SR, 32% dos voluntários tinham parentes de primeiro grau (pai e/ou mãe) com DM2 em comparação a 6% no grupo CO ($P = 0,05$).

Os resultados da avaliação da composição corporal através do DEXA demonstraram um maior percentual de gordura total (SR: $42,3 \pm 9,2$ %; CO: $23,9 \pm 5,9$ %; $P < 0,001$) e central (SR: $42,2 \pm 9,3$ %; CO: $19,4 \pm 5,4$ %; $P < 0,001$) no grupo SR em relação ao grupo CO.

Tabela 1: Características clínicas e antropométricas dos grupos sob risco e controle.

	Grupo controle (n = 17)	Grupo sob risco (n = 19)	Valor de P
Idade (anos)	14 ± 2	13 ± 3	0,18
Sexo (n feminino)	9	10	0,98
Peso (kg)	$49,3 \pm 10,8$	$78,9 \pm 19,9$ *	$< 0,01$
Altura (m)	$1,60 \pm 1,0$	$1,60 \pm 1,1$	0,12
IMC (kg/m ²)	$19,0 \pm 2,3$	$32,2 \pm 6,3$ *	$< 0,01$
Tanner (estágio 1/2/3/4/5)	0/3/3/4/7	2/4/1/7/5	$> 0,05$
Circunferência cintura (cm)	$68,5 \pm 7,3$	$98,0 \pm 15,3$ *	$< 0,01$
Circunferência quadril (cm)	$87,2 \pm 7,7$	$112,8 \pm 23,6$ *	$< 0,01$
Relação cintura/quadril (cm)	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$ *	$< 0,01$
PAS (mmHg)	102 ± 7	116 ± 13 *	$< 0,01$
PAD (mmHg)	69 ± 6	70 ± 6	0,18
Frequência cardíaca (bpm)	74 ± 9	79 ± 14	0,13

Média $\pm$ DP; * $P < 0,05$ vs grupo controle.

Apesar de os níveis de glicemia de jejum e AUC da glicose durante o TOTG serem semelhantes entre os grupos, os indivíduos do grupo SR apresentaram maiores níveis de insulina de jejum e AUC de insulina durante o TOTG (tabela 2). Estes resultados referentes à insulina tiveram correlação com o IMC ($r = 0,596$; $P = 0,007$ e $r = 0,565$; $P = 0,011$ respectivamente). Os valores de triglicerídeos no grupo SR se correlacionaram com o percentual de gordura total ($r = 0,535$; $P = 0,018$) e central ($r = 0,558$; $P = 0,013$). O índice HOMA superior nas crianças obesas é sugestivo de maior grau de resistência insulínica neste grupo.

Tabela 2: Resultados do perfil glicêmico e lipídico dos grupos sob risco e controle.

	Grupo CO	Grupo SR	Valor de P
Glicose de jejum (mg/dL)	89,5 ± 4,4	91,0 ± 6,3	0,41
AUC glicose ($\log_{10}$ mg/min/dL)	4,16 ± 0,05	4,16 ± 0,05	0,77
Insulina de jejum (μ UI/mL)	10,5 ± 4,9	27,9 ± 18,0 *	< 0,01
AUC insulina ($\log_{10}$ μ UI/min/mL)	3,92 ± 0,19	4,15 ± 0,21*	< 0,01
HOMA	2,3 ± 1,1	6,2 ± 4,0 *	< 0,01
HbA1c (%)	5,2 ± 0,3	5,4 ± 0,5	0,15
Colesterol total (mg/dL)	142,1 ± 23,1	145,4 ± 19,6	0,65
HDL (mg/dL)	42,0 ± 10,9	37,8 ± 7,7	0,19
LDL (mg/dL)	89,2 ± 15,9	92,9 ± 21,2	0,56
Triglicerídeos (mg/dL)	58,8 ± 35,0	92,0 ± 31,9 *	< 0,01
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,57 ± 0,19	0,56 ± 0,24	0,92

Média ± DP; * $P < 0,05$ vs grupo controle.

Dos oito marcadores de função endotelial avaliados, sete apresentaram valores superiores no grupo SR, como representado na figura 3. Neste grupo, os níveis de PCR apresentaram correlação com o IMC ($r = 0,564$; $P = 0,011$), índice HOMA ($r = 0,579$; $P = 0,009$), insulina de jejum ($r = 0,595$; $P = 0,007$) e triglicerídeos ($r = 0,507$; $P = 0,026$). Já os níveis de sICAM se correlacionaram com os valores de PAS ($r = 0,516$; $P = 0,028$), percentual de gordura total ($r = 0,532$; $P = 0,018$) e PCR ($r = 0,498$; $P = 0,030$).

A avaliação da reatividade macrovascular demonstrou que o diâmetro basal da artéria braquial foi semelhante entre os grupos (tabela 3). No entanto, o diâmetro máximo obtido durante a hiperemia reativa foi superior no grupo SR em comparação ao grupo CO. A figura 4 apresenta o resultado da avaliação da vasodilatação dependente de endotélio sob a forma de percentual de vasodilatação máxima na hiperemia reativa em relação ao valor de repouso. Após a administração de nitroglicerina sublingual observou-se um aumento no diâmetro arterial em comparação aos respectivos valores de repouso. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos (percentual de dilatação pós-nitroglicerina: CO = $18,02 \pm 6,87$ %; SR = $17,49 \pm 5,56$ %; $P > 0,05$). No grupo CO houve correlação entre o percentual de dilatação na HR e a PAD ($r = 0,578$, $P = 0,015$).

Tabela 3: Variações no diâmetro vascular durante hiperemia reativa e nitroglicerina dos grupos sob risco e controle.

	Grupo CO		Grupo SR	
	Basal (mm)	Dilatação máxima (mm)	Basal (mm)	Dilatação máxima (mm)
Hiperemia reativa	$3,08 \pm 1,08$	$3,11 \pm 1,31$ #	$3,57 \pm 0,32$	$3,86 \pm 0,39$ #*
Nitroglicerina	$2,94 \pm 1,13$	$3,46 \pm 1,43$ #	$3,57 \pm 0,44$	$4,18 \pm 0,46$ #

Média $\pm$ DP; * $P < 0,05$ vs grupo CO; # $P < 0,05$ vs respectivo basal.

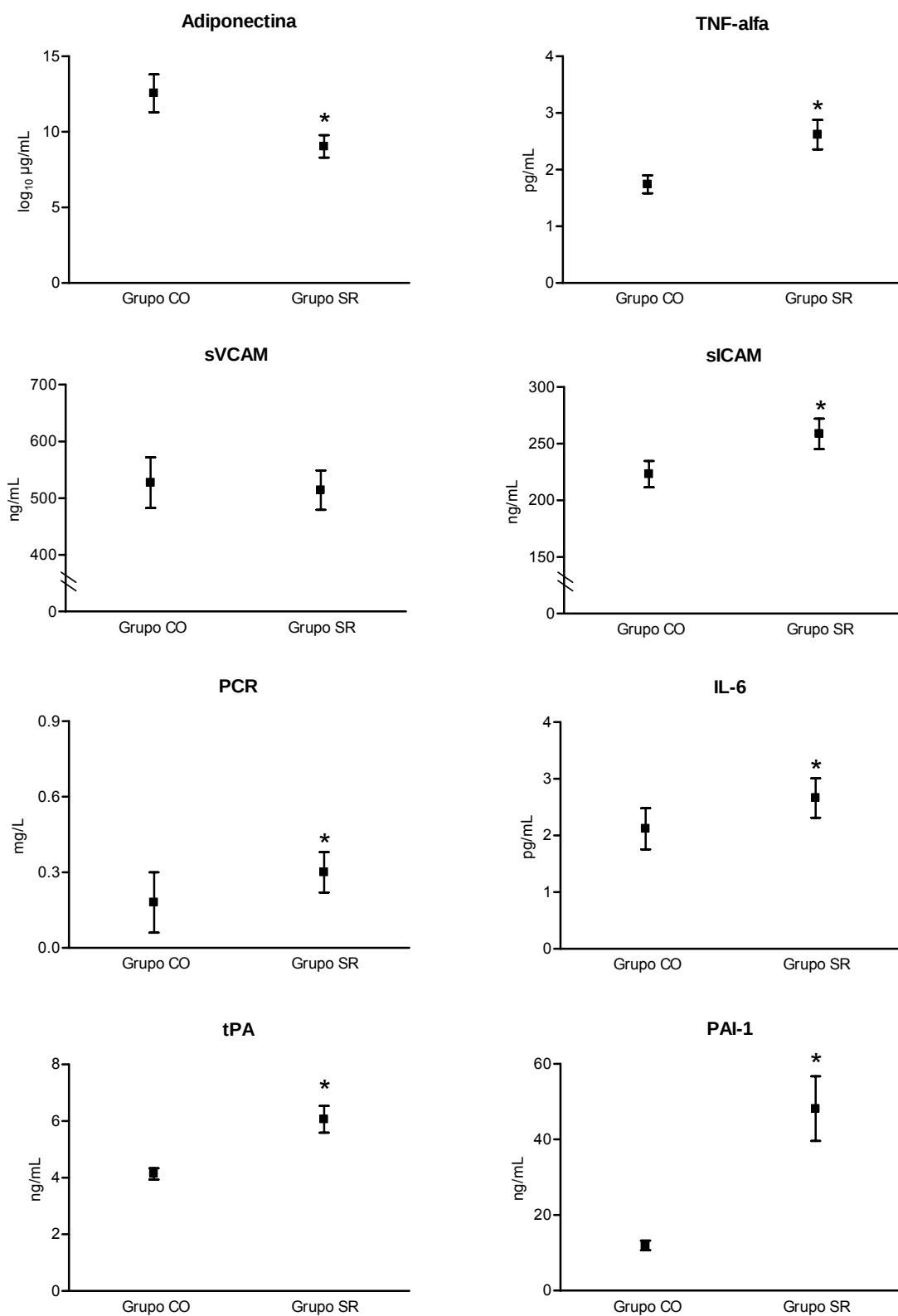


Figura 3: Marcadores de função endotelial nos grupos sob risco (SR) e controle (CO). Média $\pm$ EP; * $P < 0,05$ vs grupo CO.

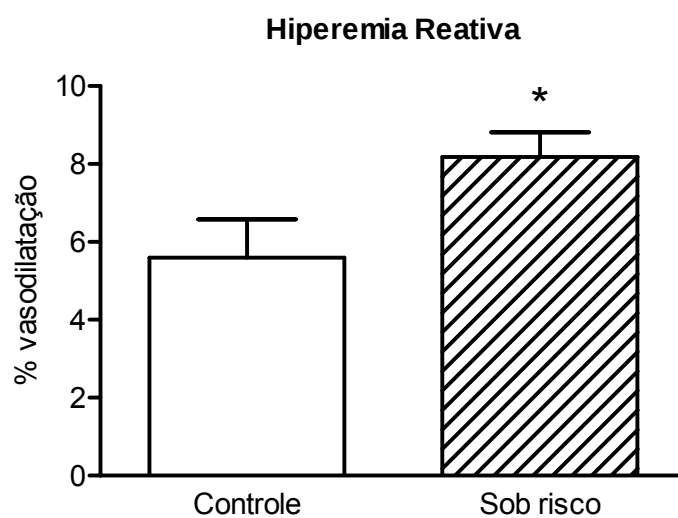


Figura 4: Percentual de vasodilatação dependente de endotélio nos grupos sob risco e controle. Média $\pm$ EP; * $P < 0,05$ vs grupo CO.

2.6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que crianças e adolescentes obesas e hispanas apresentam maior expressão de marcadores de disfunção endotelial e um aumento da resposta vasodilatadora dependente de endotélio em comparação ao grupo controle composto por crianças e adolescentes hispanas magras.

A população hispana representa um dos grupos étnicos sob maior risco de desenvolver DM2 em comparação à população branca, resultado de uma associação entre fatores genéticos e ambientais ^{34, 35}. Dentre os fatores ambientais, observa-se maior prevalência de obesidade em hispanos jovens e adultos, o que contribui para o aumento na incidência de DM2 nesta população ³⁶. A obesidade na infância é uma grande preocupação, pois independente do grupo étnico, pode representar um dos principais fatores responsáveis pelos números elevados de doença cardiovascular na fase adulta ⁶². Nos estudos *Muscatine* e *Bogalusa* a obesidade durante a infância e adolescência foi um importante determinante para fatores de risco cardiovascular, incluindo dislipidemia, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e aterosclerose ⁶³⁻⁶⁵. Mc Gill e cols ⁶⁶ demonstraram que a obesidade, avaliada através do IMC em adolescentes e adultos jovens, está associada com doença aterosclerótica em estágio avançado. Com isso, estudos realizados em crianças e adolescentes obesos, especialmente em populações onde se observa maior prevalência de obesidade, são fundamentais na compreensão da fisiopatologia do DM2 e desenvolvimento da doença cardiovascular em comparação à população adulta.

A resistência insulínica decorrente da obesidade representa um dos estágios iniciais na história natural do DM2 ⁶⁷. Especialmente a adiposidade central ou abdominal, a qual reflete um aumento da gordura visceral, provoca alterações na secreção de diversos hormônios e citocinas, que por sua vez promovem uma menor sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético ³³. A diminuição da sensibilidade à insulina é acompanhada de uma hiperinsulinemia compensatória, a qual se mantém até o esgotamento das células beta

pancreáticas. Já foi demonstrado que, independente do grau de adiposidade, crianças hispanas apresentam maiores níveis de insulina de jejum e maior grau de resistência insulínica do que crianças caucasianas ⁶⁸. Além disso, alguns autores sugerem que exista uma diferença entre etnias na resposta compensatória ao quadro de resistência insulínica. Em hispanos, esta resposta seria de um aumento na secreção de insulina ⁶⁹. Em outros grupos étnicos, como por exemplo, crianças afro-americanas, a resposta compensatória se traduziria em uma redução na extração hepática de insulina, o que manteria os níveis de insulina periférica altos sem a necessidade de aumentar sua secreção ⁵¹. No entanto, um estudo recente sugere que o mecanismo seja semelhante entre os diversos grupos étnicos, havendo diferença apenas na magnitude da resposta, onde crianças e adolescentes afro-americanas apresentariam maior resposta aguda de insulina e um menor depuração deste hormônio em comparação à população branca e hispânica ⁷⁰. Nossos resultados estão em acordo com achados anteriores, onde as crianças e adolescentes obesas apresentaram níveis aumentados de insulina de jejum e área sob a curva de insulina durante o TOTG. Este grupo também apresentou valores do índice HOMA superior ao grupo controle, o que é sugestivo de um quadro de maior resistência insulínica. Apesar de o modelo matemático do HOMA não ser o padrão-ouro para avaliação da resistência à insulina, este é um índice de fácil aplicação e apresenta uma boa correlação com a medida de sensibilidade à insulina realizada durante o teste de tolerância à glicose intravenoso, considerado um método preciso e validado para avaliação desta variável em crianças e adolescentes obesas ⁷¹. Tresaco e cols ⁷² sugerem um ponto de corte para o HOMA próximo a três em crianças e adolescentes. No entanto, não há um consenso quanto ao valor de normalidade para este índice em população jovem ou adulta.

Variáveis antropométricas como peso corporal, IMC e circunferência da cintura são preditores de risco de DM2 e doença cardiovascular em adolescentes hispanos obesos ⁷³. No estudo atual, os níveis superiores de insulina em jejum e durante o TOTG no grupo sob risco estiveram correlacionados com o IMC; estes resultados são semelhantes a estudos que avaliaram crianças e adolescentes obesos de diferentes grupos étnicos. Cruz e cols ⁷⁴

demonstraram que a gordura visceral está positivamente relacionada com os níveis de glicose e negativamente relacionada com sensibilidade à insulina em crianças hispanas obesas com história familiar de DM2. No *Bogalusa Study* ⁷⁵, uma avaliação temporal da relação entre obesidade e hiperinsulinemia demonstrou que, em crianças e adultos jovens, o melhor preditor dos níveis de insulina ao final dos três anos de acompanhamento do estudo foi o IMC inicial. Estes achados reafirmam o conceito de que os efeitos adversos da obesidade no desenvolvimento da hiperinsulinemia têm seu início na infância, independente de raça e gênero.

A hiperinsulinemia compensatória ao estado de resistência insulínica também possui implicações no perfil lipídico e hemodinâmico de crianças e adolescentes obesas ⁷⁶. Nossos resultados confirmam achados anteriores ^{62, 76, 77} onde o grupo sob risco apresentou valores superiores de pressão arterial sistólica e triglicerídeos em relação ao grupo controle, sendo que os níveis de triglicerídeos estiveram correlacionados com a AUC de insulina durante o TOTG. A relação entre menor sensibilidade à insulina e perfil lipídico aterogênico pode ser explicado através do efeito da insulina no metabolismo das lipoproteínas. A lipase lipoprotéica é regulada pela insulina em diversos níveis (expressão gênica, síntese e secreção) ⁷⁸. Na resistência insulínica o número de receptores para lipase lipoprotéica está diminuído o que compromete a depuração de triglicerídeos. Aliado à maior concentração de ácidos graxos livres, o quadro de dislipidemia da resistência insulínica se completa com uma maior produção de VLDL e LDL pequenas e densas ⁷⁹. No que se refere aos efeitos da insulina sobre a pressão arterial, este hormônio aumenta a reabsorção renal de sódio ao intensificar a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Associado a um maior tônus simpático, em parte mediado pelos níveis elevados de adipocitocinas, o quadro de hiperinsulinemia na resistência insulínica é capaz de promover um aumento nos níveis pressóricos ⁸⁰. Uma correlação positiva entre pressão arterial e níveis de insulina de jejum em crianças foi encontrado no *Bogalusa Heart Study* ⁸¹ mesmo após o ajuste para o IMC. No entanto, no presente estudo não encontramos correlação entre insulina e pressão arterial sistólica, possivelmente em função da pequena amostra avaliada.

É importante ressaltar que alguns estudos transversais demonstraram que durante a puberdade, crianças e adolescentes desenvolvem um quadro de resistência insulínica fisiológico⁸²⁻⁸⁷. O desenvolvimento puberal está associado com uma diminuição de 25-30% na sensibilidade à insulina, com o pico da redução ocorrendo no estágio III da escala de Tanner e retornando aos níveis normais no estágio V⁸⁶. Estas alterações são semelhantes entre os gêneros e parecem ter influência de etnia⁴⁵. Ball e cols⁸⁸ observaram um aumento na secreção de insulina e uma menor sensibilidade à sua ação em crianças hispanas obesas em diferentes estágios da escala de *Tanner*, mas a função da célula beta se manteve ligeiramente diminuída em grupos de maior desenvolvimento puberal. Em outros grupos étnicos observa-se uma normalização da sensibilidade à insulina no último estágio de maturação, o que representa um achado sugestivo do risco aumentado para desenvolver DM2 em população hispana⁸⁹. No presente estudo, a menor sensibilidade à insulina no grupo SR não parece ser resultante destas alterações típicas da puberdade, visto que não houve diferença entre os grupos quanto ao estágio de desenvolvimento puberal. A resistência insulínica transitória da puberdade parece ser independente do percentual de gordura corporal e dos níveis de estrogênio e testosterona, já que estes hormônios permanecem com secreção elevada até o final da puberdade^{45, 90}. Um mecanismo possível seria de que os altos níveis de hormônio do crescimento (GH) durante a puberdade causariam uma diminuição da sensibilidade à insulina, já que crianças com deficiência deste hormônio têm maior sensibilidade à insulina^{91, 92}. Ao estimular a lipólise e aumentar a secreção de ácidos graxos livres, o GH poderia contribuir para o quadro de resistência insulínica transitório da puberdade⁹². No entanto os resultados são controversos e investigações com medidas hormonais mais detalhadas são necessários para determinar o efeito dos níveis de GH na sensibilidade à insulina durante a puberdade.

O tecido adiposo é atualmente considerado um órgão endócrino capaz de secretar uma ampla variedade de peptídeos e citocinas⁴⁷. Em indivíduos obesos a secreção de adipocitocinas inflamatórias, como o TNF-alfa, IL-6, e PCR está aumentada, enquanto citocinas com efeito protetor como a adiponectina, estão diminuídas⁴⁷. Este ambiente pró-

inflamatório na obesidade está relacionado com alterações no perfil glicêmico, lipídico e na reatividade vascular ⁹³. No presente estudo foram avaliadas as concentrações de adipocitocinas em crianças e adolescentes obesas de origem hispana. Os resultados encontrados são semelhantes aos descritos na literatura, onde o grupo SR apresentou níveis elevados de citocinas inflamatórias e uma menor secreção de adiponectina em comparação ao grupo controle magro ^{94, 95}. No entanto não foi possível afirmar se estas alterações nos níveis de marcadores inflamatórios em população infanto-juvenil hispana é superior às encontradas em outros grupos étnicos. Ford et cols ⁹⁶ avaliaram a relação entre PCR e fatores de risco para doença cardiovascular em uma ampla amostra de crianças e adolescentes de diferentes etnias, incluindo hispanos e demonstraram que o IMC foi o maior preditor das concentrações de PCR; meninas hispanas apresentaram valores aumentados deste marcador em comparação à população branca. Os níveis de PCR no grupo de crianças e adolescentes obesos do presente estudo tiveram uma correlação positiva com o IMC. Já os percentuais de gordura corporal total e central se correlacionaram positivamente com os níveis de IL-6. Esta interleucina atua na regulação de proteínas de fase aguda pelo fígado, como a PCR e o fibrinogênio e está associada com índices de resistência insulínica através de mecanismo ainda não completamente elucidado ²⁷. Estudos em animais sugerem que a IL-6 inibe a ação da insulina e a transdução de sinais nos receptores deste hormônio em hepatócitos ^{97, 98}. A insulina, por sua vez, é um importante inibidor da ativação de proteínas de fase aguda mediada por citocinas e glicocorticóides, incluindo a IL-6. Logo, em um quadro de resistência insulínica, a insulina não é capaz de bloquear a ação desta interleucina, resultando em uma reação de fase aguda prolongada ⁹⁹. A IL-6 é produzida por diferentes tipos celulares incluindo o tecido adiposo e também é induzida pelo TNF-alfa, uma importante citocina inflamatória ¹⁰⁰. Níveis aumentados de TNF-alfa são descritos em indivíduos obesos e em população hispana, mas não há relatos em crianças e adolescentes deste grupo étnico. Experimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a produção aumentada de TNF-alfa pelos adipócitos possa provocar (a) alterações do metabolismo lipídico, ao estimular a lipólise e conseqüentemente aumentar a concentração de ácidos graxos livres

¹⁰¹ ou (b) promover uma diminuição na expressão de GLUT-4 (*glucose transporter-4*) nos adipócitos ¹⁰² ou (c) antagonizar a síntese e/ou ação do PPAR- γ (*peroxisome proliferator activated receptor- γ*), um importante receptor nuclear relacionado à regulação da atividade dos adipócitos e adipogênese ¹⁰³, ou ainda (d) causar alterações na sinalização de insulina ao promover a fosforilação do receptor IRS-1 (*insulin-receptor substrate-1*) ¹⁰⁴.

Os níveis de adiponectina circulantes parecem ser regulados pela IL-6, mas especialmente pelo TNF-alfa o qual inibe sua produção e expressão gênica ^{105, 106}. A adiponectina possui efeitos anti-aterogênicos, anti-inflamatórios e anti-angiogênicos ¹⁰⁶. Além disso, esta citocina atua na homeostase glicêmica ao diminuir a expressão de enzimas gluconeogênicas no fígado, inibir a produção de glicose e aumentar o efeito da insulina no fígado ¹⁰⁷. Com isso, a adiponectina e o TNF-alfa atuam de forma antagônica na modulação da ação da insulina e sugere-se que os níveis elevados de TNF-alfa e IL-6 em desordens metabólicas como a obesidade possa ser um dos responsáveis pela diminuição na produção de adiponectina ¹⁰⁶. De forma semelhante à população adulta, em crianças e adolescentes obesas os níveis de adiponectina se correlacionam negativamente com IMC, triglicerídeos e ácidos graxos livres e positivamente com sensibilidade à insulina ^{108, 109}. Além disso, a hipoadiponectinemia representa um fator de risco independente para síndrome metabólica nesta população ⁹⁵. No presente estudo, as crianças e adolescentes obesas de origem hispana apresentaram níveis de adiponectina inferiores ao grupo controle. A herdabilidade é responsável por 93% da variação nos níveis circulantes de adiponectina de jejum em crianças e adolescentes hispanas obesas. Estes valores são superiores aos encontrados em população branca e podem representar um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do DM2 e doenças cardiovasculares em população hispana jovem com obesidade ¹¹⁰. Embora a maioria dos participantes tenha apresentado histórico familiar de DM2 de primeiro e segundo grau, não houve diferença nos níveis de adiponectina entre este grupo e as crianças e adolescentes sem história familiar de DM2.

Alterações na atividade fibrinolítica são relatadas em indivíduos obesos, onde um aumento na expressão de tPA e PAI-1 estão correlacionados com IMC e índices de

resistência à insulina ¹¹¹. Foi demonstrado que a perda de peso após uma dieta hipocalórica associada à exercício físico é capaz de reverter o aumento na concentração de PAI-1 e tPA em crianças e adolescentes obesas ¹¹². O estudo atual apresenta resultados semelhantes aos encontrados na literatura, onde crianças e adolescentes hispanas obesas apresentam níveis aumentados destes marcadores ^{112, 113}. O funcionamento normal do sistema fibrinolítico depende da expressão de tPA e seu inibidor PAI-1 pelo endotélio e pela musculatura lisa vascular. Experimentos anteriores sugerem que os níveis elevados de insulina aumentariam a produção de PAI-1 nos hepatócitos ¹¹⁴ e que na obesidade a secreção desta substância pelo adipócito estaria aumentada. No *Framingham Offspring Study* ¹¹⁵, níveis elevados de PAI-1 e fator de von Willebrand apresentaram correlação positiva para o desenvolvimento de DM2, independente de outros fatores de risco como HOMA e níveis de triglicerídeos. O aumento na concentração de t-PA em obesos pode representar um mecanismo compensatório ao aumento de PAI-1 promovido pela hiperinsulinemia, na tentativa de manter o equilíbrio da atividade fibrinolítica ¹¹³.

As alterações metabólicas causadas pela obesidade possuem repercussões vasculares, onde fatores como hiperinsulinemia e níveis aumentados de marcadores inflamatórios representam uma agressão à integridade das células endoteliais ¹⁷. A disfunção endotelial é um processo degenerativo lento e silencioso, onde o endotélio íntegro gradativamente perde suas propriedades de proteção vascular, passando a ter predominantemente uma atividade pró-inflamatória e pró-aterogênica ⁴. Considerando que crianças e adolescentes obesos possuem maior concentração de adipocitocinas inflamatórias, esta população poderia apresentar alteração na função endotelial, o que representaria um estágio inicial no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Além das adipocitocinas outros marcadores plasmáticos, como as moléculas de adesão celular, são utilizados na investigação da função endotelial ⁹. Estas moléculas são expressas em células endoteliais e leucócitos em resposta a citocinas inflamatórias como TNF-alfa e PCR, e facilitam o rolamento, adesão e migração dos leucócitos para o espaço sub-endotelial, eventos iniciais na formação da placa aterosclerótica ⁸. No *Nurses' Health Study* níveis

aumentados de marcadores de disfunção endotelial, incluindo sVCAM-1 e sICAM-1, foram preditores independentes de DM2 em mulheres inicialmente saudáveis ¹¹. As concentrações de sVCAM-1 e sICAM-1 estão aumentadas em população infanto-juvenil obesa, havendo correlação entre os níveis de sVCAM-1 e LDL e entre s-ICAM e IMC ¹¹⁶. As modificações no perfil metabólico promovidas pela obesidade, além de causar resistência insulínica promoveriam disfunção das células endoteliais, o que implicaria em uma ativação das moléculas de adesão celular solúveis ¹¹⁷. No presente estudo o grupo SR apresentou maior concentração de sICAM-1, o qual obteve correlação com os níveis de PAS e percentual de gordura total.

A análise da reatividade vascular, juntamente com a dosagem de marcadores plasmáticos tem sido utilizada na investigação da função endotelial ⁹. A avaliação da dilatação mediada pelo fluxo com ultra-som de alta resolução foi originalmente descrita em um estudo envolvendo crianças com história familiar de hipercolesterolemia ⁴⁹, as quais apresentaram menor vasodilatação dependente de endotélio na hiperemia reativa. Deste então, esta técnica vem sendo amplamente utilizada na investigação das alterações na reatividade vascular frente a diferentes fatores de risco para doenças cardiovasculares como obesidade e DM2. Estudos anteriores demonstraram que a função endotelial encontra-se comprometida em obesos de diferentes grupos etários, incluindo crianças e adolescentes, já que a dilatação mediada pelo fluxo neste grupo estaria diminuída em comparação indivíduos magros ^{39, 40, 118}. Ribeiro e cols ³⁹ encontraram níveis pressóricos aumentados e menor condutância vascular em crianças brasileiras obesas durante exercício estático (preensão manual) e no teste de estresse mental. Um aumento do tônus simpático associado a uma diminuição na produção de NO provocada pela maior secreção de adipocitocinas inflamatórias pode contribuir para a menor resposta vasodilatadora em obesos ¹⁷. A PCR, assim como o TNF-alfa, diminui a biodisponibilidade de NO ²⁹, estimula a secreção de endotelina-1 e a expressão de moléculas de adesão ¹¹⁹, além de favorecer a apoptose de células endoteliais ¹²⁰. Os efeitos pró-aterogênicos da PCR parecem ser potencializados por diversos fatores de risco, incluindo a hiperglicemia ¹²¹, a qual inibe a NOS endotelial (eNOS)

e induz estresse oxidativo em células endoteliais e células musculares lisas, inativando o NO e provocando a síntese de peroxinitrito ⁴. Deste modo, a biodisponibilidade de NO vai sendo progressivamente reduzida concomitante ao aumento da síntese de peroxinitrito, o qual compromete a síntese de vasodilatadores e promove maior secreção de vasoconstritores.

A insulina por sua vez também possui efeitos vasculares ao promover vasodilatação mediada por NO, aumentar a expressão gênica e a atividade da NOS constitutiva e conseqüentemente aumentar a biodisponibilidade de NO ¹²². A via de sinalização celular responsável pela produção de NO estimulada pela insulina seria a mesma utilizada por este hormônio para promover a captação de glicose em tecidos como musculatura esquelética, coração e tecido adiposo. Alterações nesta cascata enzimática na resistência insulínica, causada por fatores genéticos ou adquiridos, promoveriam um efeito combinado sobre os processos mediados pela insulina, ou seja, transporte intracelular de glicose e vasodilatação ¹²². No entanto, outros autores sugerem que a hiperinsulinemia aguda causa disfunção endotelial por aumentar o estresse oxidativo ¹²³ e/ou o tônus simpático vascular ¹²⁴. Da mesma forma que a resistência insulínica promove disfunção endotelial, alterações na vasodilatação mediada por NO parecem contribuir para a resistência insulínica ¹²⁵. A insulina promove um redirecionamento do fluxo sanguíneo para leitos capilares nutritivos ao promover o relaxamento de vasos de resistência, aumentando o número de capilares perfundidos, fenômeno conhecido como recrutamento capilar; o conseqüente aumento na distribuição de nutrientes favorece o acesso da insulina e da glicose para o metabolismo de um maior número de células musculares ¹²⁶. A infusão de TNF-alfa ou L-NAME, um inibidor da NOS, inibe o recrutamento da microvasculatura muscular mediada pela insulina, o que sugere que este efeito seja mediado pela produção de NO endotelial ¹²⁷.

Embora estudos anteriores tenham sugerido que a obesidade em população infanto-juvenil esteja relacionada com alterações no perfil metabólico e na reatividade vascular ^{39, 40, 118}, até o momento não há relatos na literatura que avaliem estes parâmetros especificamente em crianças e adolescentes de origem hispana. No estudo atual o grupo

sob risco, composto por voluntários hispanos obesos na faixa etária de 10 a 18 anos, apresentou maior percentual de vasodilatação dependente de endotélio em comparação ao grupo controle composto por voluntários magros. Não houve diferença significativa na vasodilatação independente de endotélio, o que sugere a manutenção da integridade do músculo liso vascular e que possivelmente as alterações observadas se limitam a fatores relacionados ao endotélio. Considerando que os aspectos metodológicos que poderiam influenciar estes achados foram controlados (como período do ciclo menstrual em meninas e análise dos dados por avaliador único, o qual não teve acesso às informações dos participantes) algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar estes resultados. A primeira seria uma maior vasodilatação em função das maiores concentrações de insulina no grupo sob risco, envolvendo os mecanismos descritos acima. Ainda que não tenha sido observada uma correlação entre insulina e o percentual de vasodilatação durante a hiperemia reativa, os níveis de insulina de jejum e a AUC deste hormônio durante o TOTG nas crianças e adolescentes obesas foram superiores em comparação ao grupo controle, o que poderia estar contribuindo para a maior resposta vasodilatadora no grupo sob risco. A segunda hipótese envolveria mecanismos metabólicos e vasculares relacionados à história natural do DM2 e que poderiam auxiliar na compreensão dos resultados encontrados no presente estudo. Conforme citado anteriormente, a fase inicial de resistência insulínica se caracteriza por uma hiperinsulinemia compensatória que é mantida até a falência das células beta pancreáticas, quando a secreção deste hormônio diminui drasticamente caracterizando o quadro de DM2 ³². Uma resposta compensatória semelhante poderia estar ocorrendo nas células endoteliais, o que representaria uma fase extremamente precoce no mecanismo de disfunção endotelial em resposta à obesidade, caracterizada por um aumento da resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio. Uma vez que os agentes agressores fossem mantidos, ou seja, a resistência insulínica associada a elevadas concentrações de adipocitocinas inflamatórias, o endotélio entraria em disfunção, com diminuição progressiva da sua capacidade vasodilatadora.

O aumento da taxa de filtração glomerular nas fases iniciais do diabetes tipo 1 e tipo 2 é um segundo exemplo de resposta compensatória presente na história natural do diabetes. Estes achados fortaleceriam a hipótese de que um mecanismo compensatório vascular semelhante possa ter participação na maior resposta vasodilatadora encontrada no presente estudo. A hiperfiltração glomerular ocorre em função de alterações morfológicas, mas principalmente hemodinâmicas dos rins e precede a falência renal típica do diabetes ¹²⁸. Neste aspecto, mecanismos interessantes relacionam as alterações iniciais da função renal com o endotélio. As três isoformas de NOS são encontradas nos rins e o NO controla o tônus vascular aferente e eferente, o coeficiente de ultrafiltração e o fluxo sanguíneo medular, além de possuir efeitos natriuréticos ¹²⁹. O diabetes estimula mecanismos que em paralelo aumentam e suprimem a biodisponibilidade renal de NO, onde nas fases iniciais da nefropatia diabética observa-se uma produção aumentada de NO. A mais importante alteração hemodinâmica renal no diabetes é uma diminuição na resistência das arteríolas aferentes resultando em um aumento da pressão hidrostática nos capilares glomerulares e conseqüentemente um aumento da taxa de filtração glomerular. Pelo mecanismo de retroalimentação tubuloglomerular, quando o fluxo de líquido ao longo do túbulo distal aumenta em conseqüência do aumento da taxa de filtração glomerular, as células da mácula densa enviam um sinal parácrino para a arteríola aferente que então se contrai, aumentando a resistência e diminuindo a taxa de filtração ¹³⁰. Estudos anteriores demonstraram que a NOS neuronal (nNOS) inibe a vasoconstrição da arteríola aferente pelo mecanismo de retroalimentação tubuloglomerular e controla desta forma a pressão intraglomerular ¹³¹. Das três isoformas de NOS, a nNOS é expressa predominantemente na mácula densa e parece contribuir substancialmente na produção renal alterada de NO e seus efeitos hemodinâmicos ¹²⁸. Os mecanismos celulares que modulam o efeito da nNOS na nefropatia diabética ainda não são completamente esclarecidos, mas alguns estudos sugerem que a insulina, ao ativar a via da proteína quinase Akt, promove ativação da nNOS e também da eNOS em diferentes tecidos. Com o prolongamento do quadro de diabetes, a produção de NO diminui ou é neutralizada pelo acúmulo de radicais superóxido e produtos finais de

glicação. Estes fatores levam a uma perda progressiva da proteção contra outros aspectos relacionados à fisiopatologia da nefropatia, como o sistema renina-angiotensina, endotelina, citocinas e moléculas de adesão ¹²⁸. Komers e cols ¹²⁹ sugerem que nas fases iniciais da nefropatia diabética os mecanismos que aumentam a disponibilidade de NO nos rins prevalecem, o que estaria associado às alterações hemodinâmicas observadas nesta fase. Com a progressão temporal da doença, os fatores que suprimem a biodisponibilidade de NO gradualmente predominariam.

A hiperinsulinemia compensatória na resistência insulínica e a hiperfiltração renal mediada por NO nos primeiros estágios da nefropatia diabética representam dois mecanismos envolvidos na fisiopatologia do diabetes e exemplificam importantes adaptações sistêmicas anteriores à falência pancreática e renal respectivamente ³². O achado de maior vasodilatação dependente de endotélio em crianças e adolescentes obesos é sugestivo de que alterações semelhantes às descritas anteriormente possam ocorrer no endotélio de outros leitos vasculares, onde em uma fase inicial haveria uma hiperreatividade vascular compensatória; com a manutenção da secreção aumentada de adipocitocinas que progressivamente lesam as células endoteliais ¹⁷, o quadro de disfunção finalmente se estabeleceria, confirmando os achados da literatura. Estudos longitudinais, nos quais os parâmetros metabólicos e vasculares deste grupo de indivíduos fossem investigados ao longo dos anos, poderiam auxiliar na confirmação desta hipótese.

Os resultados do presente estudo devem ser considerados frente à suas limitações. Não foi possível estabelecer uma comparação entre os resultados antropométricos, metabólicos e vasculares encontrados em crianças e adolescentes hispanas em comparação a outros grupos étnicos. Muito embora o número amostral tenha sido calculado como suficiente para detectar diferenças entre os grupos quanto a vasodilatação endotélio dependente, o poder estatístico para as análises de regressão múltipla foi limitado o que inviabilizou seu cálculo. Além disso, o grupo sob risco apresentou uma tendência a ter um maior percentual de parentes de 1º grau com DM2 em comparação ao grupo controle. Sabe-se que a história familiar de DM2 representa um fator de risco para o desenvolvimento da

doença e alguns estudos que avaliaram indivíduos com histórico familiar e resistência insulínica têm encontrado maior concentração de marcadores de disfunção endotelial e menor reatividade vascular ¹³².

2.7 CONCLUSÕES

Crianças e adolescentes hispanas obesas apresentam maior concentração de marcadores de disfunção endotelial em comparação a crianças magras do mesmo grupo étnico. No entanto, a reatividade vascular deste grupo encontra-se aumentada. Estes resultados são originais na avaliação de população infanto-juvenil hispana. Os achados de maior vasodilatação dependente de endotélio nas crianças sob risco podem representar um evento precoce na evolução da disfunção endotelial causada pela obesidade.

CAPÍTULO 3

ESTUDO II: REATIVIDADE VASCULAR E FUNÇÃO ENDOTELIAL DE INDIVÍDUOS COM HISTÓRIA FAMILIAR DE DIABETES TIPO 2

3.1 INTRODUÇÃO

O DM2 é um conjunto de alterações metabólicas que resulta em uma ausência ou diminuição significativa na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas ³². Um fator comum na história natural do DM2 é o quadro de resistência insulínica, que se desenvolve anos antes do diagnóstico da doença propriamente dita. A resistência à insulina é acompanhada de uma hiperinsulinemia compensatória que culmina com a falência das células beta caso os fatores etiológicos sejam mantidos ³². Dentre os fatores de risco para desenvolver DM2 estão o sedentarismo, a obesidade e o histórico familiar de DM2, especialmente em parentes de primeiro grau ³³. O DM2 é denominado uma doença multifatorial, pois depende não só de influências ambientais como também de múltiplos fatores genéticos ¹³³. Os indícios de que esta doença tem um forte componente genético são provenientes de estudos em famílias com DM2, pela observação de altas prevalências em determinados grupos étnicos e pela alta taxa de concordância (50-95%) entre gêmeos monozigóticos ¹³⁴. No aspecto histórico familiar de DM2, a relação entre o risco de desenvolver diabetes em parentes em relação ao risco da população geral é estimada em 3,5 para parentes de primeiro grau e 1,5 para parentes de segundo grau ¹³⁵. Dados mais atuais do “*Framingham Offspring Study*” ¹¹⁵, onde os filhos da população original do estudo de *Framingham* foram acompanhados durante 20 anos, demonstram que o risco para desenvolver DM2 foi 3,5 vezes maior quando o pai ou a mãe eram diabéticos e 6 vezes maior quando o pai e a mãe eram diabéticos em comparação a indivíduos sem história familiar de DM2. Recentemente foi descrito que uma mutação no gene da enzima lipase

éster carboxil causa disfunção da célula beta e desenvolvimento precoce de diabetes em uma forma monogênica da doença ¹³⁶.

Estudos que têm investigado indivíduos com HF $\oplus$ sugerem que aspectos antropométricos, metabólicos e vasculares da doença tenham um componente hereditário ^{132, 137, 138}. No entanto, os resultados são conflitantes. Tripathy e cols ¹³⁸ demonstraram que indivíduos com HF $\oplus$ apresentam valores superiores de PAS, triglicerídeos, insulina de jejum e índice HOMA. Quando estes voluntários foram estratificados de acordo com a relação cintura/quadril dos seus ascendentes, os familiares cujos ascendentes estavam no último quartil da relação cintura/quadril apresentaram maior grau de resistência insulínica e valores superiores de colesterol e triglicerídeos em comparação aos parentes cujos ascendentes estavam no primeiro quartil. Um fator importante é que neste estudo o grupo HF $\oplus$ apresentava maior IMC e relação cintura/quadril em comparação ao grupo HF $\ominus$. Este é um aspecto importante já que no indivíduo obeso, citocinas secretadas pelo tecido adiposo promovem uma diminuição da sensibilidade à insulina além de promover alterações hemodinâmicas e vasculares ¹⁷. A conclusão de que o fator HF $\oplus$ está associado a alterações no perfil metabólico a partir de uma comparação entre indivíduos controles (HF $\ominus$) e parentes com maior IMC ou maior percentual de gordura corporal não assegura que o fator causal destas alterações seja o HF $\oplus$ e não o sobrepeso ou a obesidade. Para exemplificar, Mitchell e cols ¹³⁷ ao avaliar indivíduos da comunidade de *San Luis* como parte do *Insulin Resistance Atherosclerosis (IRAS) Family Study* pareados quanto à idade e IMC, não encontraram diferença nos valores de glicemia de jejum, sensibilidade à insulina ou gordura visceral entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$. Desta forma, fatores que promovem alterações em variáveis metabólicas, hemodinâmicas ou vasculares devem ser controlados em estudos que avaliam os efeitos do HF $\oplus$.

Ainda que não haja consenso quanto à presença de alterações metabólicas em familiares de diabéticos, os estudos que demonstraram tais alterações não chegaram a uma conclusão quanto aos mecanismos envolvidos ¹³⁹⁻¹⁴¹. Um estudo avaliando adolescentes

brasileiros com HF $\oplus$ estratificados por IMC demonstrou que os grupos sobrepeso e obesidade apresentaram valores superiores de insulina de jejum e índice HOMA e menor sensibilidade à insulina quando comparados ao grupo com IMC normal ¹⁴². Apenas o grupo obeso apresentou alteração na função da célula beta e maiores níveis de triglicerídeos e PAS. No entanto, os resultados não foram comparados com uma população controle sem história familiar de DM2. Pimenta e cols ¹⁴³ avaliaram adultos jovens brasileiros, pareados quanto à idade, sexo, IMC e relação cintura/quadril. Não foram encontradas diferenças em qualquer variável do perfil lipídico (níveis de colesterol, triglicerídeos, HDL) e glicêmico (glicose e insulina de jejum, HbA1c) entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$. Os autores sugerem que os resultados de sensibilidade à insulina e função de célula beta semelhantes entre os grupos estão relacionados ao fato da amostra ser composta de indivíduos jovens, que mesmo apresentando HF $\oplus$, possuem tolerância à glicose normal e não apresentam fatores adquiridos, como obesidade, os quais promovem uma alteração na secreção de insulina ¹⁴³. Uma revisão sistemática de estudos que avaliaram a sensibilidade e secreção de insulina em familiares de diabéticos demonstrou que do total de trabalhos avaliados 49% indicaram função de célula beta prejudicada, 38% não encontraram qualquer alteração e 13% indicaram hipersecreção da célula beta ¹⁴⁴. Quanto à sensibilidade à insulina, 54% dos estudos não detectaram alterações e 46% demonstraram menor sensibilidade insulínica em familiares. Segundo o autor, muitos destes estudos apresentam vieses metodológicos, como inclusão de indivíduos com intolerância à glicose ou obesidade, o que o fez concluir que (a) pessoas com predisposição genética à secreção alterada de insulina desenvolvem DM2 somente quando a resistência insulínica, em decorrência da obesidade, se sobrepõe e excede a capacidade de compensação pela célula beta e (b) não existe evidência suficiente para fortalecer o conceito de que indivíduos com história familiar de diabetes e tolerância à glicose normal apresentem resistência insulínica independente de fatores como idade, obesidade e distribuição de gordura corporal ¹⁴⁴.

Apesar dos numerosos estudos investigando a relação entre HF $\oplus$ e variáveis do perfil glicêmico, os efeitos vasculares tem sido pouco explorados. Esta investigação é de grande relevância, pois a disfunção endotelial associada às alterações metabólicas no quadro evolutivo do DM2, que incluem hiperinsulinemia, resistência à insulina e secreção aumentada de adipocitocinas, representa um dos estágios iniciais no desenvolvimento das complicações macrovasculares do DM2 ⁴. A perda da integridade do endotélio já é bem caracterizada em pacientes com DM2. No entanto, os poucos estudos que investigaram os aspectos vasculares de indivíduos com HF $\oplus$ de primeiro grau apresentam resultados igualmente conflitantes. Caballero e cols ¹³² demonstraram que indivíduos com HF $\oplus$ apresentam menor reatividade macro e microvascular, maior concentração de endotelina e sVCAM além de maiores níveis pressóricos. No entanto, não foram encontradas diferenças entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ em variáveis do perfil glicêmico ou lipídico. Já McSorley e cols ¹⁴⁵ ao avaliarem adultos jovens saudáveis, não identificaram alteração na sensibilidade à insulina ou diminuição da resposta vasodilatadora dependente de endotélio no grupo com histórico familiar. Ao estratificar indivíduos com HF $\oplus$ por níveis de sensibilidade à insulina, Balletshofer e cols ³⁷ demonstraram que parentes com resistência insulínica apresentam menor dilatação mediada pelo fluxo, a níveis semelhantes aos encontrados em pacientes com DM2. No entanto, não foram identificadas diferenças na resposta vasodilatadora entre parentes com sensibilidade insulínica preservada e indivíduos controles sem histórico familiar, sugerindo que o grau de sensibilidade à insulina deve ser considerado ao avaliar a relação entre histórico familiar de DM2 e função endotelial.

A diversidade nos resultados de estudos com familiares de diabéticos pode ser decorrente de aspectos metodológicos, como por exemplo, o não pareamento para fatores importantes como IMC e sensibilidade à insulina, assim como por diferenças étnicas. A população brasileira representa uma das populações mais heterogêneas do mundo. Estudo do DNA de brasileiros da raça branca, os quais representam cerca de 57% da população do país, demonstrou que 39% têm origem européia, 33% têm origem ameríndia e 28% têm

origem africana ¹⁴⁶. Esta diversidade genética poderia influenciar variáveis metabólicas e vasculares em indivíduos com história familiar de DM2 frente aos achados atuais disponíveis na literatura em outros grupos étnicos.

3.2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a reatividade macrovascular e a função endotelial em indivíduos com história familiar de DM2.

3.2.1 Objetivos específicos

- Analisar o perfil glicêmico e lipídico de indivíduos com HF $\oplus$ em comparação a um grupo com HF $\ominus$;
- Avaliar o perfil de marcadores plasmáticos relacionados à função endotelial em indivíduos com HF $\oplus$ em comparação a um grupo com HF $\ominus$;
- Comparar a resposta vasodilatadora dependente de endotélio em indivíduos com HF $\oplus$ em comparação a um grupo com HF $\ominus$;
- Analisar as variáveis metabólicas e vasculares dos grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ estratificados pelo índice de massa corpórea.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Amostra

Voluntários com história familiar de DM2, na faixa etária entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos, foram selecionados para participar do estudo. Foi considerado histórico familiar positivo quando o indivíduo fosse filho e/ou irmão de um paciente com DM2 (parentesco de 1º grau). Um grupo controle sem história de DM2, pareado ao grupo de parentes para idade, sexo e IMC também foi selecionado. Os voluntários pertencentes a este grupo não poderiam apresentar histórico familiar de DM2 em 1ª ou 2ª geração, ou seja, pais ou avós com DM2. Apenas um voluntário de cada família pode participar do estudo.

Os critérios de exclusão foram:

- a) glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL e/ou após sobrecarga de glicose ≥ 140 mg/dL ²¹;
- b) colesterol total ≥ 240 mg/dL e/ou triglicerídeos ≥ 200 mg/dL e/ou LDL ≥ 160 mg/dL ⁵⁶;
- c) tabagistas ou ex-tabagistas há menos de seis meses;
- d) portadores de doenças crônicas;
- e) uso regular de medicações;
- f) mulheres em período gestacional;
- g) mulheres em uso de terapia de reposição hormonal;
- h) praticantes de atividade física regular ou adeptos de programa de condicionamento físico; ex-praticantes de atividade física regular há menos de seis meses.

3.3.2 Protocolo

O recrutamento dos participantes para o estudo foi feito a partir da abordagem aos pacientes com DM2 atendidos no ambulatório de Endocrinologia do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense e através de anúncios em rádios, jornais e mídia eletrônica.

Os indivíduos selecionados foram esclarecidos quanto aos procedimentos a serem adotados no estudo, previamente aprovado pelo Comitê de Ética da instituição (CEP 030/04) e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A avaliação completa incluiu duas visitas no período da manhã. Os voluntários realizaram um jejum de 12 horas e abstinência de álcool e atividade física nas 24 horas anteriores a cada visita. Para diminuir a influência das variações hormonais sobre as variáveis vasculares e metabólicas do estudo, todas as mulheres foram avaliadas durante a fase folicular (após o término da menstruação, até o 12º dia do ciclo).

Visita 1

a) Coleta de sangue e TOTG.

Uma amostra inicial de sangue foi coletada para realização das seguintes dosagens: glicose (método enzimático automatizado - glicose oxidase/peroxidase; Dimension, Polymedco, Cortland Mayor - EUA), insulina plasmática (quimioluminescência; Sistema Immulite, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA), colesterol total, triglicerídeos e HDL (método enzimático automatizado - colesterol oxidase/peroxidase; Dimension, Polymedco, Cortland Mayor - EUA), LDL (calculado pela fórmula de Friedewald⁵⁹), PCR (Turbidimetria - BORN) e leptina (radioimunoensaio; Linco Research Inc., St Charles, MO, EUA). Parte do volume desta amostra inicial foi centrifugada para extração do soro, o qual foi congelado e mantido a -70°C para a posterior dosagem dos seguintes marcadores

plasmáticos de ativação endotelial: adiponectina (ELISA, Chemicon, Temecula, CA - EUA) e sICAM (ELISA, BioSource, Camarillo, CA - EUA).

Em seguida foi realizado o TOTG. As medidas de glicose e insulina foram realizadas nos minutos 0, 30, 60, 90 e 120 após a administração oral de 75 g de dextrosol. Utilizando os valores de glicose e insulina obtidos no TOTG foram calculadas as respectivas áreas sob a curva e o índice de resistência à insulina utilizando o modelo matemático do HOMA (insulina jejum x glicose jejum/22,5) ⁶⁰.

b) Quantificação de células progenitoras circulantes (CPCs)

As CPCs (CD34+CD45Lo) foram quantificadas na fração mononuclear do sangue periférico em um subgrupo de dez voluntários (HF $\oplus$ = 5; HF $\ominus$ = 5) por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Califórnia - EUA). Um volume total de 20 ml de sangue fresco obtido da amostra inicial, ou seja, antes da administração do dextrosol, foi utilizado para a quantificação das CPCs, sendo as amostras processadas em até duas horas após sua coleta. A fração de mononucleares foi separada através de gradiente de *Ficoll* (Ficoll-PaqueTM Plus; Amersham Biosciences, Uppsala - Suíça). As células foram lavadas com solução tampão de FACS (PBS suplementado com 3% de soro fetal bovino e 0,01% de azida sódica) e incubadas com os anticorpos anti-CD34 (clone 8G12) conjugado a PE e anti-CD45 (clone 2D1) conjugado a FITC (Becton Dickinson, Califórnia - EUA) por 30 minutos em gelo. Em seguida, as células foram novamente lavadas com tampão de FACS e a aquisição foi feita em um citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Califórnia - EUA) utilizando o software CELLQuest 3.1 (Becton Dickinson, Califórnia - EUA). Posteriormente os resultados foram analisados utilizando o software WinMDI 2.8. A caracterização das CPCs foi realizada de acordo com as recomendações do International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) ¹⁴⁷.

Visita 2

a) Medidas antropométricas

Peso e altura (Welmy, Santa Bárbara, SP - Brasil).

b) Avaliação da reatividade macrovascular

A metodologia de pletismografia de oclusão venosa (EC6, DE, Hokanson Inc, Bellevue, WA - EUA) foi utilizada para avaliação do fluxo sanguíneo do antebraço em resposta à hiperemia reativa e preensão manual. Inicialmente os voluntários permaneceram em repouso na posição de decúbito durante 15 minutos em sala com temperatura controlada (24°C). Após este período foi realizada uma medida de pressão arterial com esfigmomanômetro digital (Omron HealthCare Inc, Dalian - China) e um registro de frequência cardíaca (FC - Polar Advantage, Kempele - Finlândia). Foram posicionados um manguito pneumático na parte superior do braço, um transdutor elástico preenchido com mercúrio (*strain gauge*) na maior circunferência do antebraço e um manguito adicional no punho. Um suporte foi utilizado para sustentar o braço ao nível do coração (figura 5). Um minuto antes de cada medida e durante todo o período de registro, o manguito do punho foi inflado a 200 mmHg para exclusão da circulação da mão. O fluxo sanguíneo do antebraço foi determinado inflando rapidamente o manguito superior a 50 mmHg durante 10 segundos para ocluir a circulação venosa, seguido de 10 segundos de deflação, completando ciclos de 20 segundos cada. A média de seis ciclos foi usada para determinar o fluxo sanguíneo basal, avaliado como a relação de mudança de volume do antebraço durante a oclusão venosa e expresso como mL/100 mL de tecido/min.

O método de hiperemia reativa pós-oclusiva foi utilizado como indicador da vasodilatação dependente do endotélio e consiste em insuflar o manguito superior a 200 mmHg durante cinco minutos. Após este período o manguito foi desinflado e o fluxo sanguíneo no antebraço foi avaliado nos três minutos seguintes como descrito anteriormente.

A força muscular por preensão manual foi avaliada através da dinamometria (Therapeutic Instruments, Clifton, NJ - EUA) no membro contra lateral ao braço onde foi realizada a avaliação de fluxo. Inicialmente foi determinada a força estática máxima, definida como o valor mais alto de força gerado durante três tentativas consecutivas de 2-5 segundos cada separadas por um intervalo de 1 minuto. Após a realização de um novo registro basal do fluxo sanguíneo (cerca de 10 minutos após a hiperemia reativa), foi solicitado ao voluntário que sustentasse 30% da força máxima por um período de três minutos. A avaliação do fluxo sanguíneo do antebraço foi realizada continuamente do 10º segundo após o término do exercício até o 3º minuto. A FC foi monitorada continuamente e a pressão arterial foi aferida no 2º minuto de exercício e no 3º minuto de recuperação.



Figura 5: Avaliação da reatividade vascular com pletismografia de oclusão venosa.

O sinal do pletismógrafo foi transmitido para um computador usando uma placa de conversão A/D (National Instruments, Austin, TX - EUA) e os resultados foram analisados posteriormente utilizando um software específico para este fim o qual foi desenvolvido na linguagem LabView® em parceria com o Programa de Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A lógica desta medida baseia-se na determinação do coeficiente angular da regressão volume do antebraço versus tempo. A análise dos dados foi conduzida por um único investigador, o qual não teve conhecimento do grupo ao

qual pertencia cada voluntário. A variabilidade intra-observador (coeficiente de variação) foi de 1,4% para medidas basais e 1,8% para hiperemia reativa.

Os valores de AUC foram calculados como um índice fluxo-tempo para a hiperemia reativa e preensão manual. A reatividade vascular foi considerada como o fluxo total em excesso acima dos valores basais e foi calculada como a diferença entre o valor máximo de fluxo durante a hiperemia reativa e após a preensão manual e seus respectivos fluxos basais. A condutância vascular foi calculada pela fórmula: fluxo sanguíneo do antebraço / pressão arterial média.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho apropriado da amostra de sete indivíduos para cada grupo foi calculado utilizando uma diferença na média de 5% e o desvio-padrão igual a 3%, ambos obtidos em experimentos anteriores e ajustando-se o poder do teste estatístico para 0,8 e o erro alfa para 0,05¹⁴⁸.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente aplicado aos dados para verificar se havia homocedasticidade e se a distribuição dos mesmos era normal e desta forma, determinar a adequação do uso de procedimentos paramétricos. A comparação inicial entre os resultados obtidos nos grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ foi realizada utilizando o teste t de *Student* no caso de variáveis com distribuição normal. Caso contrário, o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado como procedimento não paramétrico. Variáveis descontínuas foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado.

Após a análise inicial os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ foram estratificados de acordo com o IMC em HF $\oplus$ e HF $\ominus$ magros e HF $\oplus$ e HF $\ominus$ sobrepeso. Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) “*two-way*”, seguida do teste de Bonferroni como procedimento *post-hoc*.

O coeficiente de correlação produto-momento de Pearson, ou correlação de Spearman no caso de distribuições não normais, foi utilizado para se determinar a associação entre variáveis e a equação que descreve esta correlação foi determinada pelo método de regressão linear. A interação entre as diferentes variáveis tendo como variável dependente “excesso de fluxo na hiperemia reativa” foi avaliada através de regressão linear múltipla, aplicando como critério para inclusão das variáveis independentes a ocorrência de um valor de *P* na regressão linear simples menor que 0,20¹⁴⁹. Foram ajustados modelos de regressão múltipla separados para HF $\oplus$ e HF $\ominus$.

Um valor de *P* menor do que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são apresentados sob a forma de média $\pm$ desvio padrão. O pacote estatístico

GraphPad Prism 4 (GraphPad - San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para a análise estatística.

3.5 RESULTADOS

Cento e oito voluntários foram inicialmente selecionados para o estudo. No entanto, 32 foram excluídos por apresentarem dislipidemia ($n = 15$) ou dislipidemia associada à intolerância à glicose ($n = 6$) ou por serem ex-fumantes ou ex-praticantes de atividade física há menos de 6 meses ($n = 4$) ou por apresentarem histórico familiar de segundo grau ($n = 2$) ou desistiram de participar do estudo ($n = 5$). Em 2006, com a mudança nos critérios de normalidade para glicemia de jejum de 110 mg/dL para 100 mg/dL ²¹, outros 11 participantes previamente avaliados foram excluídos. Desta forma, 65 voluntários atenderam completamente os critérios de inclusão e completaram o protocolo de avaliação do estudo.

Como demonstrado na tabela 4, os grupos encontravam-se pareados para todas as características clínicas e antropométricas avaliadas. Um maior percentual de mulheres no grupo HF $\oplus$ fazia uso de pílulas anticoncepcionais (HF $\oplus$: 38%; HF $\ominus$: 10%; $P < 0,05$).

Tabela 4: Características clínicas e antropométricas dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2.

	HF $\ominus$ ($n = 31$)	HF $\oplus$ ($n = 34$)	Valor de P
Sexo (n feminino)	23	28	0,42
Idade (anos)	33 $\pm$ 9	33 $\pm$ 9	0,98
Peso (kg)	66,4 $\pm$ 10,8	66,3 $\pm$ 11,1	0,48
Altura (m)	1,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	0,40
IMC (kg/m ²)	23,9 $\pm$ 3,1	23,9 $\pm$ 3,2	0,46
PAS repouso (mmHg)	118 $\pm$ 11	119 $\pm$ 13	0,38
PAD repouso (mmHg)	67 $\pm$ 8	71 $\pm$ 9	0,10
FC repouso (bpm)	65 $\pm$ 7	67 $\pm$ 7	0,38

De forma semelhante, não foram identificadas diferenças entre os grupos nos resultados do perfil glicêmico e lipídico (tabela 5). Por razões técnicas, não foi possível realizar a análise dos níveis de glicose e insulina no TOTG em duas voluntárias do grupo HF $\oplus$.

Tabela 5: Resultados do perfil glicêmico e lipídico dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2.

	HF $\ominus$ (n = 31)	HF $\oplus$ (n = 34)	Valor de P
Glicose de jejum (mg/dL)	87,0 $\pm$ 6,1	85,9 $\pm$ 6,4	0,24
Insulina de jejum (μ UI/mL)	5,4 $\pm$ 2,4	6,4 $\pm$ 3,0	0,08
AUC glicose (log ₁₀ mg/min/dL)	4,07 $\pm$ 0,07	4,10 $\pm$ 0,07	0,11
AUC insulina (log ₁₀ μ UI /min/dL)	3,68 $\pm$ 0,20	3,69 $\pm$ 0,23	0,42
Índice HOMA	1,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,7	0,10
Colesterol total (mg/dL)	173,7 $\pm$ 26,6	180,8 $\pm$ 31,3	0,17
LDL colesterol (mg/dL)	102,4 $\pm$ 25,1	107,9 $\pm$ 26,7	0,20
HDL colesterol (mg/dL)	56,6 $\pm$ 12,9	57,2 $\pm$ 13,5	0,43
Triglicerídeos (mg/dL)	75,2 $\pm$ 33,8	80,3 $\pm$ 33,2	0,27

No grupo HF $\oplus$ o IMC apresentou correlação com os níveis de PAS ($r = 0,462$; $P = 0,007$) e PAD ($r = 0,447$; $P = 0,008$). Já no grupo HF $\ominus$, os valores pressóricos se correlacionaram com os níveis de triglicerídeos (PAS: $r = 0,460$; $P = 0,009$ e PAD: $r = 0,417$; $P = 0,019$) assim como a glicose ($r = 0,471$; $P = 0,007$).

A figura 6 apresenta os resultados dos marcadores relacionados à função endotelial. Os níveis de leptina apresentaram correlação com o IMC (HF $\oplus$: $r = 0,360$; $P = 0,036$ e HF $\ominus$: $r = 0,509$; $P = 0,003$) e com a variável sexo feminino (HF $\oplus$: $r = 0,586$; $P < 0,001$ e HF $\ominus$: $r = 0,618$; $P < 0,001$) em ambos os grupos.

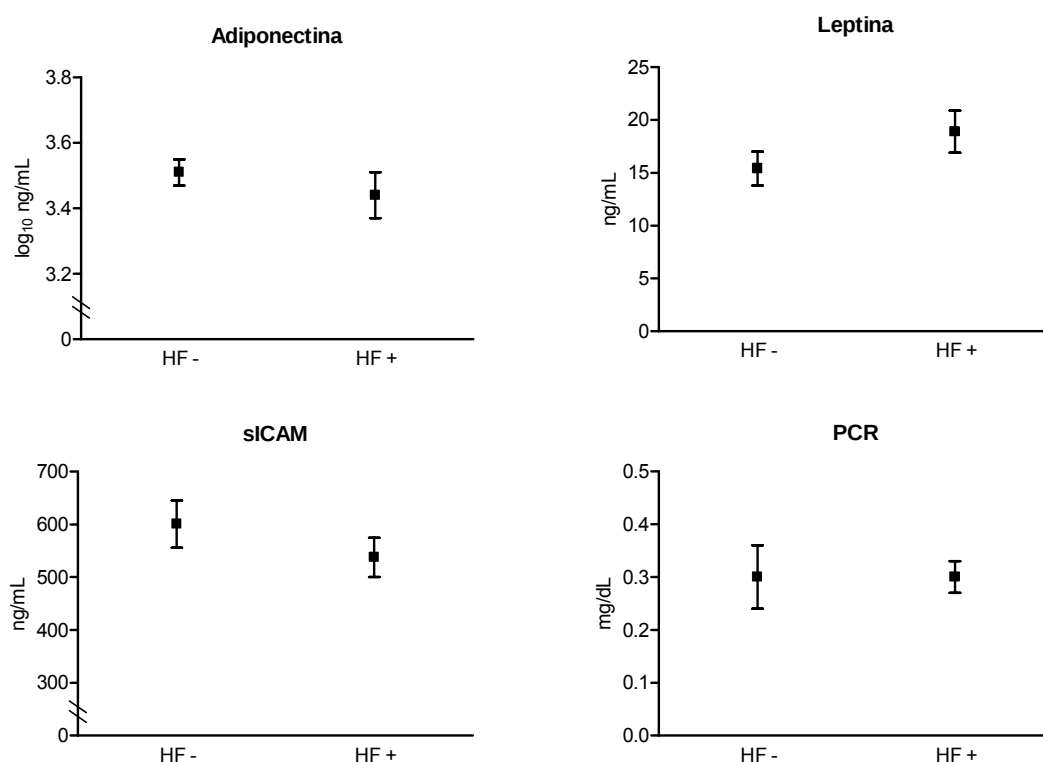


Figura 6: Resultados dos marcadores de função endotelial dos grupos com história familiar positiva (HF+) e negativa (HF-) de DM2. Média $\pm$ EP.

Na avaliação da reatividade vascular, os valores absolutos assim como a AUC na hiperemia reativa e após a prensão manual foram semelhantes entre os grupos, conforme ilustrado na figura 7. Na regressão linear múltipla para o grupo HF $\oplus$ foram incluídas as seguintes variáveis: sexo, HDL, LDL, triglicerídeos, sICAM, leptina, IMC e PAD. O modelo ajustado foi significativo ($R = 0,731$; $P = 0,015$), mas não foi possível identificar uma variável que apresentasse correlação independente com o excesso de fluxo na hiperemia reativa. O modelo utilizado no grupo HF $\ominus$ ($R = 0,719$; $P = 0,040$) inclui as variáveis IMC, idade, PAS, PAD, HDL, LDL, glicose e triglicerídeos, sendo a idade identificado como o fator de correlação independente com o excesso de fluxo na hiperemia reativa ($r = 0,251$; $P = 0,049$). A correção dos valores de fluxo sanguíneo pela pressão arterial média para estimativa da condutância vascular demonstrou que, em ambos os grupos, os valores de condutância

durante a hiperemia reativa e após a preensão manual foram superiores aos seus respectivos valores basais; no entanto, não houve diferença entre os grupos (tabela 6).

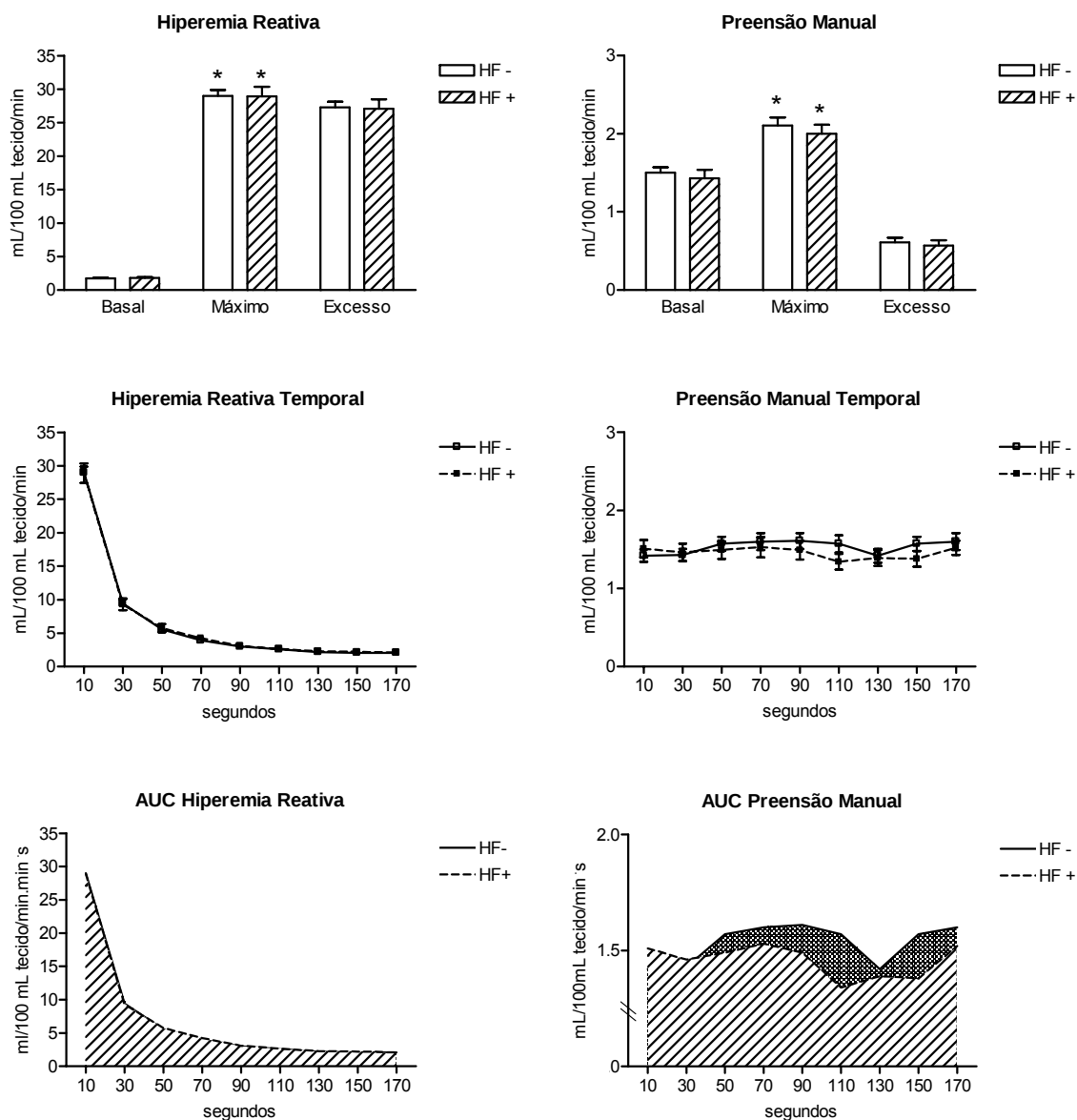


Figura 7: Resultados da avaliação da reatividade vascular dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2. Média $\pm$ EP; * $P < 0,05$ vs basal do mesmo grupo.

Tabela 6: Valores de condutância vascular na hiperemia reativa e preensão manual dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2.

	HF $\ominus$		HF $\oplus$	
	Basal	Pós	Basal	Pós
Hiperemia reativa (U)	2,09 $\pm$ 0,13	34,53 $\pm$ 0,93 *	2,08 $\pm$ 0,15	33,14 $\pm$ 1,49 *
Preensão manual (U)	1,80 $\pm$ 0,09	2,39 $\pm$ 0,12 *	1,64 $\pm$ 0,11	2,32 $\pm$ 0,16 *

* $P < 0,05$ vs basal.

Durante a preensão manual os valores de PAS (HF $\ominus$ = 152 $\pm$ 18 mmHg; HF $\oplus$ = 153 $\pm$ 19 mmHg), PAD (HF $\ominus$ = 90 $\pm$ 10 mmHg; HF $\oplus$ = 94 $\pm$ 21 mmHg), PAM (HF $\ominus$ = 111 $\pm$ 12 mmHg; HF $\oplus$ = 114 $\pm$ 18 mmHg) e FC (HF $\ominus$ = 92 $\pm$ 12 bpm; HF $\oplus$ = 93 $\pm$ 10 bpm) foram superiores aos seus respectivos valores de repouso ($P < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados ($P > 0,05$).

Em um subgrupo de cinco voluntários do grupo HF $\oplus$ (três mulheres; 28 $\pm$ 8 anos; 68,6 $\pm$ 15,2 kg; 23,7 $\pm$ 4,9 kg/m²) e cinco voluntários do grupo HF $\ominus$ (três mulheres; 35 $\pm$ 8 anos; 69,3 $\pm$ 15,7; 23,7 $\pm$ 3,9 kg/m²) foi realizada a quantificação das CPCs. A figura 8 apresenta o resultado do percentual de CPCs nos grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ e a representação da análise de citometria de fluxo de um voluntário do grupo HF $\oplus$. Não foram encontradas diferenças entre os grupos no percentual ou número de células CD34+CD45Lo por volume de sangue (HF $\oplus$ = 1,88 x 10⁶ células / mL; HF $\ominus$ = 0,78 x 10⁶ células / mL; $P > 0,05$).

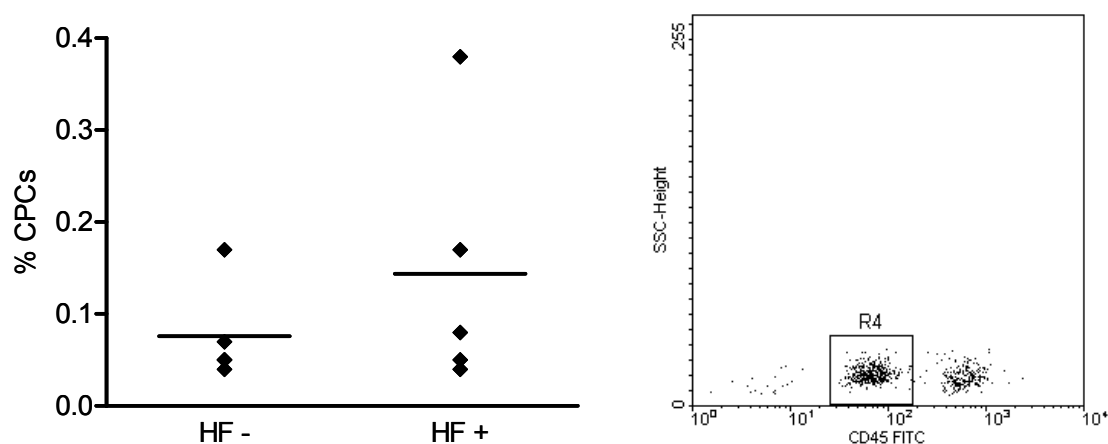


Figura 8: Resultados do percentual de células progenitoras circulantes (CPCs) no sangue periférico dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 (à esquerda) e representação dos resultados de um voluntário do grupo HF+ (à direita).

Após esta avaliação inicial dos resultados obtidos entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$, uma análise complementar foi realizada estratificando os grupos de acordo com o IMC. Desta forma, o grupo HF $\oplus$ foi classificado em HF $\oplus$ magro, composto de voluntários com IMC menor que 25 kg/m² e HF $\oplus$ sobrepeso, formado por voluntários com IMC entre 25 e 29,9 kg/m². O mesmo procedimento foi adotado para o grupo HF $\ominus$. As características antropométricas e clínicas dos quatro grupos são apresentadas na tabela 7.

Os voluntários magros dos grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ eram mais jovens que os respectivos grupos com sobrepeso. Das mulheres pertencentes ao grupo HF $\oplus$ magro, 63% faziam uso de pílula anticoncepcional em comparação a 20% das mulheres do grupo HF $\ominus$ magro ($P = 0,027$).

Tabela 7: Características antropométricas dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC.

	HF $\ominus$		HF $\oplus$	
	Magro (n = 20)	Sobrepeso (n = 11)	Magro (n = 20)	Sobrepeso (n = 14)
Sexo (n feminino)	15	8	16	12
Idade (anos)	31 $\pm$ 8	37 $\pm$ 8 *	30 $\pm$ 8	37 $\pm$ 8 *
Peso (kg)	61,8 $\pm$ 8,9	74,8 $\pm$ 9,0 *	60,8 $\pm$ 8,5	74,1 $\pm$ 9,7 *
Altura (m)	1,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,1
IMC (kg/m ²)	22,0 $\pm$ 2,0	27,3 $\pm$ 1,5 *	21,7 $\pm$ 1,9	27,1 $\pm$ 1,1 *
PAS repouso (mmHg)	116 $\pm$ 12	120 $\pm$ 9	116 $\pm$ 13	123 $\pm$ 12
PAD repouso (mmHg)	67 $\pm$ 9	69 $\pm$ 5	69 $\pm$ 9	74 $\pm$ 8
FC repouso (bpm)	65 $\pm$ 8	65 $\pm$ 7	68 $\pm$ 6	65 $\pm$ 8

* $P < 0,05$ vs respectivo HF magro.

Os resultados dos exames laboratoriais são apresentados na tabela 8. A glicemia de jejum e os níveis de LDL foram superiores no grupo HF $\oplus$ sobrepeso em relação ao HF $\oplus$ magro. Quanto aos marcadores relacionados à função endotelial, com exceção dos valores de leptina que foram superiores nos grupos com sobrepeso (HF $\oplus$ e HF $\ominus$), outras diferenças não foram encontradas nos resultados intra (magro vs sobrepeso) ou inter-grupos (HF $\oplus$ vs HF $\ominus$).

No grupo HF $\oplus$ magro o IMC apresentou correlação com a PAS ($r = 0,632$; $P = 0,003$) e insulina de jejum ($r = 0,489$; $P = 0,028$). A leptina se correlacionou com o fator sexo feminino em todos os grupos (HF $\oplus$ magro: $r = 0,607$; $P = 0,004$ / HF $\oplus$ sobrepeso: $r = 0,619$; $P = 0,018$ / HF $\ominus$ magro: $r = 0,587$; $P = 0,006$ / HF $\ominus$ sobrepeso: $r = 0,655$; $P = 0,028$), com a insulina de jejum nos grupo HF $\oplus$ magro ($r = 0,534$; $P = 0,015$) e HF $\oplus$ sobrepeso ($r = 0,648$; $P = 0,016$) e com o IMC no grupo HF $\ominus$ sobrepeso ($r = 0,825$; $P = 0,002$).

Tabela 8: Perfil glicêmico, lipídico e de marcadores de função endotelial dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC.

	HF ⊖		HF ⊕	
	Magro (n = 20)	Sobrepeso (n = 11)	Magro (n = 20)	Sobrepeso (n = 14)
<i>Perfil glicêmico</i>				
Glicose de jejum (mg/dL)	86,9 ± 6,1	87,3 ± 6,5	83,5 ± 6,5	89,4 ± 4,5 *
Insulina de jejum (μUI/mL)	5,7 ± 2,6	4,8 ± 1,9	6,6 ± 3,3	6,1 ± 2,7
AUC glicose (log ₁₀ mg/min/dL)	4,09 ± 0,06	4,05 ± 0,07	4,08 ± 0,08	4,12 ± 0,06
AUC insulina (log ₁₀ μUI /min/dL)	3,69 ± 0,23	3,73 ± 0,10	3,71 ± 0,23	3,66 ± 0,24
Índice HOMA	1,2 ± 0,6	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,7	1,3 ± 0,6
<i>Perfil lipídico</i>				
Colesterol total (mg/dL)	170,3 ± 28,2	179,9 ± 23,3	173,4 ± 33,2	191,4 ± 26,0
LDL colesterol (mg/dL)	96,8 ± 26,2	112,5 ± 20,1#	99,5 ± 23,9	119,9 ± 26,6 *
HDL colesterol (mg/dL)	58,0 ± 13,9	54,3 ± 11,3	58,2 ± 15,3	55,9 ± 10,7
Triglicerídeos (mg/dL)	79,2 ± 40,0	67,9 ± 17,2	80,9 ± 31,9	79,5 ± 36,1
<i>Marcadores de função endotelial</i>				
PCR (mg/dL)	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2
Leptina (ng/mL)	11,8 ± 5,6	21,8 ± 10,2 *	15,5 ± 9,7	23,9 ± 12,9 *
Adiponectina (log ₁₀ ng/mL)	3,52 ± 0,27	3,49 ± 0,12	3,35 ± 0,48	3,56 ± 0,18
sICAM (ng/mL)	593,9 ± 253,6	613,1 ± 250,1	551,6 ± 247,0	517,2 ± 170,0

*P < 0,05 vs respectivo grupo HF magro; # P = 0,05 vs respectivo grupo HF magro.

Os resultados da avaliação da reatividade vascular são apresentados na figura 9. Todos os grupos apresentaram valores superiores de fluxo sanguíneo durante a hiperemia reativa e após a preensão manual em relação aos seus respectivos fluxos basais. No entanto, observou-se que nos grupos HF ⊕ sobrepeso e HF ⊖ sobrepeso o fluxo máximo e

de excesso durante a hiperemia reativa foram maiores quando comparados com os resultados dos grupos HF $\oplus$ magro e HF $\ominus$ magro respectivamente. Esta diferença se limitou à análise intra-grupos, não havendo portanto diferença em qualquer dos sub-grupos HF $\oplus$ em relação à HF $\ominus$. Para os outros parâmetros de reatividade vascular avaliados (fluxo sanguíneo após preensão manual, resposta temporal e AUC durante a hiperemia reativa e após preensão manual) não foram encontradas diferenças nas análises intra ou inter-grupos (tabela 9). No grupo HF $\ominus$ magro, o fluxo de excesso na HR apresentou correlação com PAS ($r = 0,560$; $P = 0,010$).

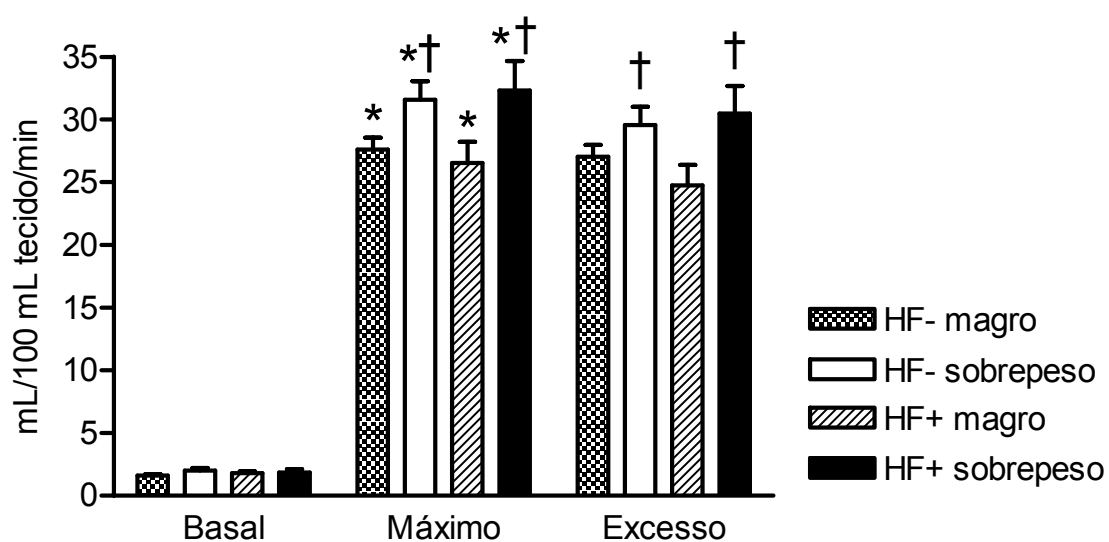


Figura 9: Resposta à hiperemia reativa nos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC. * $P < 0,05$ vs respectivo basal; † $P < 0,05$ vs respectivo HF magro.

Tabela 9: Resultados de fluxo sanguíneo após preensão manual e área sob a curva dos testes de reatividade vascular em indivíduos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC.

	HF ⊖		HF ⊕	
	Magro (n = 20)	Sobrepeso (n = 11)	Magro (n = 20)	Sobrepeso (n = 14)
AUC da HR (ml/100mL tecido/min·s)	886,29 ± 211,22	883,61 ± 167,67	877,92 ± 366,84	927,99 ± 400,05
<i>Preensão manual</i>				
Basal (ml/100mL tecido/min)	1,44 ± 0,39	1,62 ± 0,42	1,38 ± 0,54	1,50 ± 0,73
Máximo (ml/100mL tecido/min)	1,99 ± 0,48	2,32 ± 0,66	1,98 ± 0,74	2,02 ± 0,63
Excesso (ml/100mL tecido/min)	0,56 ± 0,35	0,70 ± 0,36	0,61 ± 0,45	0,52 ± 0,42
AUC (ml/100mL tecido/min·s)	232,96 ± 52,89	270,60 ± 82,75	234,25 ± 89,78	226,33 ± 82,89

Durante a preensão manual os valores de pressão arterial e frequência cardíaca foram maiores em relação aos valores de repouso; no entanto não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$; dados não apresentados). Padrão semelhante foi observado para condutância vascular, que foi maior durante a hiperemia reativa e após a preensão manual em comparação aos respectivos valores de repouso para todos os grupos; não foram encontradas diferenças nos resultados entre os grupos (tabela 10).

Tabela 10: Valores de condutância vascular na hiperemia reativa e preensão manual dos grupos com história familiar positiva e negativa de DM2 classificados por IMC.

	Hiperemia Reativa		Preensão Manual	
	Basal	Pós	Basal	Pós
HF $\ominus$ magro (U)	1,94 $\pm$ 0,66	33,28 $\pm$ 4,40 *	1,75 $\pm$ 0,52	2,30 $\pm$ 0,65 *
HF $\ominus$ sobrepeso (U)	2,34 $\pm$ 0,76	36,81 $\pm$ 5,91 *	1,88 $\pm$ 0,50	2,56 $\pm$ 0,78 *
HF $\oplus$ magro (U)	2,13 $\pm$ 0,70	31,47 $\pm$ 8,43 *	1,62 $\pm$ 0,54	2,44 $\pm$ 1,06 *
HF $\oplus$ sobrepeso (U)	2,01 $\pm$ 1,06	35,52 $\pm$ 8,79 *	1,66 $\pm$ 0,81	2,16 $\pm$ 0,75 *

* $P < 0,05$ vs basal.

3.6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a reatividade vascular e variáveis metabólicas em indivíduos com história familiar de DM2. Os resultados demonstraram que o grupo de parentes de primeiro grau de diabéticos possuem um perfil glicêmico, lipídico e vascular semelhante ao grupo controle sem história familiar de DM2 pareado para IMC, sexo e idade. Quando estratificados por IMC, os indivíduos com sobrepeso, HF ⊕ ou HF ⊖, apresentaram reatividade vascular e níveis leptina e LDL maiores em comparação aos voluntários magros.

O DM2 possui um componente hereditário, onde parentes de primeiro grau de diabéticos possuem um risco 3,5 maior de desenvolver a doença ¹⁵⁰. Desta forma, indivíduos com histórico familiar de DM2, assim como aqueles com intolerância à glicose ou história de diabetes gestacional são classificados como sob risco de desenvolver DM2 ³³. Diversos estudos têm afirmado que o histórico familiar de DM2 está associado com alterações metabólicas precoces que incluem hiperglicemia ¹⁵¹, resistência insulínica ¹³⁹, maiores níveis pressóricos ⁸¹ e dislipidemia ¹⁵². No *Bogalusa Heart Study* uma amostra de 1.136 filhos de pacientes com DM2 estratificados por faixa etária (crianças, adolescentes e adultos jovens), foram acompanhados por uma média de 15 anos ¹⁵³. Neste grupo, o histórico familiar de DM2 foi considerado preditor independente de alterações longitudinais na adiposidade, glicemia, níveis de insulina, índice HOMA, pressão arterial e LDL colesterol, independente de raça e gênero. Foi encontrada maior prevalência de obesidade visceral e generalizada, hiperinsulinemia, hiperglicemia, LDL e triglicerídeos aumentados, HDL diminuído e hipertensão em indivíduos com HF ⊕. Interessante observar que em todas as faixas etárias analisadas os valores de IMC e dobra cutânea sub-escapular foram superiores no grupo HF ⊕, embora as alterações de glicose, insulina e índice HOMA só fossem encontradas no grupo de adolescentes e adultos jovens. Isto é condizente com os achados de que a obesidade na infância é um importante preditor de resistência insulínica na fase adulta e que

a prevenção da obesidade é eficaz em evitar o aparecimento do diabetes ¹⁵³. No entanto, este estudo apresenta um viés metodológico comum a outros que encontraram alterações metabólicas em parentes de diabéticos, onde os grupos com HF $\oplus$ apresentam maior percentual de gordura corporal ou já possuem maior grau de resistência à insulina em comparação ao grupo de referência. Ao considerar os efeitos sistêmicos do aumento da adiposidade corporal e da resistência insulínica, não é possível afirmar que indivíduos com HF $\oplus$ e maior percentual de gordura corporal apresentam um perfil metabólico pró-aterogênico inerente ao fator histórico familiar de DM2. A maior secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo em indivíduos obesos possui efeitos diretos sobre o metabolismo glicídico ¹⁷. Este fato, associado ao maior tônus simpático característico da obesidade, faz com que valores elevados de pressão arterial e resistência insulínica sejam achados comuns em obesos ⁹³. Desta forma, as alterações bioquímicas e vasculares encontradas em familiares de diabéticos podem ser meramente um efeito da obesidade *per se*. Em alguns estudos onde o fator gordura corporal foi controlado entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$, os achados de alterações metabólicas e vasculares em familiares de diabéticos não são conclusivos. Nyholm e cols ¹⁵⁴ demonstraram que indivíduos com HF $\oplus$ apresentam resistência insulínica e maior acúmulo de gordura visceral comparado a controles HF $\ominus$ com IMC e gordura corporal total semelhante. No estudo de Groop e cols ¹⁵⁵ os valores da relação cintura/quadril foram superiores em indivíduos com HF $\oplus$, os quais também apresentaram menor taxa de metabolismo basal, enquanto os níveis de glicose e insulina de jejum assim como variáveis do perfil lipídico e os níveis pressóricos foram idênticos entre os grupos. No presente estudo, foram avaliados voluntários com HF $\oplus$ de primeiro grau pareados a um grupo controle para variáveis que sabidamente tem influência sobre parâmetros bioquímicos e vasculares como IMC, idade e gênero. Além disso, indivíduos com intolerância à glicose ou dislipidemia foram excluídos. Os resultados encontrados demonstram que não houve diferença quanto ao perfil glicêmico e lipídico no grupo HF $\oplus$ em comparação ao HF $\ominus$. O índice HOMA também foi semelhante entre os grupos, sugerindo

que a sensibilidade à insulina esteve preservada. Apesar do HOMA ser um método indireto de avaliação da resistência insulínica, apresenta uma boa correlação com o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado o padrão-ouro ⁶⁰. Estes resultados estão em acordo com achados anteriores de um estudo conduzido em população brasileira adulta, onde parentes de primeiro grau de pacientes com DM2 com tolerância à glicose normal, adequadamente pareados a indivíduos com HF $\ominus$, não apresentaram alterações na secreção ou sensibilidade à de insulina ou no perfil lipídico ¹⁴³.

O estudo da reatividade vascular em parentes de primeiro grau de diabéticos ainda é pouco explorado em comparação às numerosas investigações dos efeitos metabólicos do histórico familiar de DM2. Caballero e cols ¹³² avaliaram a reatividade micro e macrovascular e dosaram marcadores de função endotelial em indivíduos com HF $\oplus$. O IMC e todos os parâmetros do perfil glicêmico e lipídico foram semelhantes ao grupo controle (HF $\ominus$), embora os parentes tivessem maiores níveis de PAS e PAD. A vasodilatação macrovascular em resposta à hiperemia reativa e microvascular após a administração de acetilcolina por iontoforese foi menor no grupo HF $\oplus$ em comparação ao HF $\ominus$. Além disso, foram encontradas maiores concentrações de endotelina-1 e sVCAM nos parentes, enquanto os níveis de fator de Von Willebrand e sICAM foram semelhantes ao grupo HF $\ominus$. Já Lee ¹⁵⁶ e Middlebrooke ¹⁵⁷ não encontraram alterações microvasculares em voluntários com HF $\oplus$, enquanto McSorley e cols ¹⁴⁵ não identificaram respostas diferenciadas à infusão de acetilcolina sobre a vasodilatação macrovascular em parentes comparado a controles. Uma vez que os achados não são conclusivos, surge a hipótese de que modificações da reatividade vascular estejam associadas a alterações metabólicas como maior secreção de adipocitocinas, hiperinsulinemia e dislipidemia. Uma vez que estas variáveis se mantenham dentro dos limites de normalidade, não haveria estímulos que diretamente provocassem disfunção endotelial. Um exemplo que pode fortalecer esta hipótese é o estudo de Balletshofer e cols ³⁷ onde uma menor resposta vasodilatadora dependente de endotélio só foi encontrada em parentes que apresentavam resistência insulínica, que por sua vez

também apresentavam maior IMC e menores níveis de HDL. Nenhuma diferença foi identificada em variáveis metabólicas e vasculares nos parentes com sensibilidade à insulina preservada em relação aos controles (HF $\ominus$). A relação causa-efeito entre resistência insulínica e disfunção endotelial ainda não está completamente esclarecida, mas alguns autores sugerem que a resistência insulínica promova disfunção endotelial em função de uma resistência do endotélio ao efeito modulador da insulina na produção de NO¹⁵⁸, enquanto outros afirmam que a disfunção endotelial ao diminuir a redistribuição de fluxo sanguíneo para capilares nutritivos na microcirculação do músculo esquelético, limita a disponibilidade de insulina neste tecido e no interstício, promovendo resistência insulínica sistêmica¹²⁶. No presente estudo a reatividade vascular de indivíduos com história familiar de DM2 e níveis glicêmicos e lipídicos normais foi semelhante ao grupo de referência. Os fatores idade, sexo e IMC foram semelhantes entre os grupos, o que fortalece ainda mais a hipótese anterior de que a reatividade vascular só se altera em decorrência de uma perturbação metabólica. Apesar de uma proporção maior de mulheres do grupo HF $\oplus$ fazer uso de pílulas anticoncepcionais, este fator parece não exercer efeito direto sobre a resposta da reatividade vascular¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Independente deste fato, todas as voluntárias do sexo feminino foram avaliadas na fase folicular.

Os marcadores que expressam ativação endotelial analisados foram semelhantes entre os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ e estes resultados se assemelham a outros descritos na literatura. Níveis de sVCAM¹⁶², PCR e adiponectina¹⁶³ semelhantes entre indivíduos com HF $\oplus$ e HF $\ominus$ já foram descritos anteriormente. No entanto, outros estudos contrariam estes resultados, sugerindo que parentes de diabéticos apresentam concentrações alteradas destes marcadores^{162, 164, 165} e também de leptina¹⁶⁶. Apesar dos níveis de leptina apresentarem uma tendência a serem maiores no grupo HF $\oplus$ do presente estudo esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P = 0,086$). Os resultados desta adipocitocina apresentaram correlação com a variável sexo feminino em ambos os grupos, o que está em acordo com estudos anteriores demonstrando que mulheres produzem maior quantidade de

leptina em comparação aos homens ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Na análise multivariada buscou-se identificar alguma variável que apresentasse correlação independente com o excesso de fluxo durante a hiperemia reativa. Embora no grupo HF $\ominus$ a idade tenha correlação independente com o fluxo, no grupo HF $\oplus$ não foi possível identificar um fator que isoladamente estivesse correlacionado com a reatividade vascular. O modelo de regressão utilizado foi significativo e as variáveis incluídas eram representantes de todos os parâmetros que possuem influência sobre a reatividade vascular (antropométrico, hemodinâmico, bioquímico e vascular). Estes resultados sugerem que a resposta de fluxo tenha um caráter multifatorial e integrativo, onde a reatividade vascular varia paralelamente ao conjunto de variáveis que a determinam.

As células progenitoras circulantes contribuem para a manutenção da integridade da camada de células endoteliais e para a revascularização do tecido isquêmico ¹⁷⁰. A adesão destas células aos sítios de vascularização e sua subsequente infiltração e digestão do tecido alvo resultaria no crescimento de um novo vaso sanguíneo ¹⁷¹. Além disso, acredita-se que a adesão das CPCs às células endoteliais ativadas seja capaz de reconstituir o endotélio disfuncional em função da secreção de mediadores de proliferação e migração ¹⁷². O número e a função das CPCs estão diminuídas em pacientes com fatores de risco cardiovascular, especialmente naqueles com diabetes, através de mecanismos ainda não esclarecidos ^{173, 174}. Krankel e cols ¹⁷¹ demonstraram que a cultura de CPCs proveniente de indivíduos saudáveis em meio hiperglicêmico resultou em aumento da apoptose e diminuição na proliferação destas células. No presente estudo, não foram encontradas diferenças no percentual de CPCs no grupo HF $\oplus$ em relação ao grupo HF $\ominus$. Os dados apresentaram uma grande dispersão, o que pode ser resultante do pequeno número amostral e/ou pode sugerir que esta seja uma característica típica da população brasileira. Apesar do cálculo amostral ter demonstrado que seriam necessários, no mínimo, quatro voluntários para detectar uma diferença de aproximadamente 30% entre as médias a partir de experimentos anteriores ¹⁷⁵, é fundamental uma ampliação desta amostra para que seja possível concluir se parentes de

diabéticos possuem maior, menor ou igual mobilização de CPCs em comparação a indivíduos sem história familiar de DM2.

Indivíduos obesos, ou seja, com um IMC ≥ 30 kg/m² não foram incluídos na presente investigação. Mas como o critério de inclusão adotado abrangia voluntários magros e com sobrepeso, foi realizada uma segunda análise onde os grupos HF $\oplus$ e HF $\ominus$ foram estratificados de acordo com o IMC. O objetivo foi identificar se haveria alguma modificação nos resultados obtidos inicialmente ao analisar indivíduos com sobrepeso separadamente. Um estudo anterior, onde foi adotada metodologia semelhante, demonstrou que o grupo HF $\oplus$ apresentou hiperinsulinemia independente do IMC e afirma que a natureza heterogênea do DM2 e a variabilidade étnica podem contribuir para os resultados inconclusivos encontrados na investigação das alterações metabólicas em parentes de diabéticos ¹⁷⁶. No presente estudo, os voluntários com IMC < 25 kg/m² foram mais jovens em comparação ao seu grupo sobrepeso correspondente (HF $\oplus$ ou HF $\ominus$). O resultado do perfil lipídico demonstrou que os indivíduos com sobrepeso apresentaram maior concentração de LDL, ainda que os valores estivessem dentro dos limites de normalidade. A oxidação da LDL é um evento de grande importância na fisiopatologia da aterosclerose. Em contato com células endoteliais, macrófagos ou células musculares lisas que produzem radicais de oxigênio, as partículas de LDL sofrem oxidação progressiva. A LDL oxidada passa a ser reconhecida por receptores de superfície dos macrófagos, os quais incorporam esta partícula e tornam-se ricos em conteúdo lipídico. Formam-se assim as células espumosas, características da estria gordurosa, que é a lesão mais precoce reconhecida no início da aterosclerose ⁴. A LDL oxidada exerce outras ações importantes tais como a produção de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e interleucina-1, diminuição da recirculação de monócitos residentes, o que retém monócitos na camada subendotelial, e ação tóxica direta sobre o endotélio, o que causa lesão estrutural do mesmo ⁴. A oxidação de LDL pode ser promovida por um maior percentual de gordura corporal total e abdominal ¹⁷⁷ e a LDL

parcialmente oxidada está correlacionada com resistência insulínica, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e baixa concentração de HDL em indivíduos sadios ¹⁷⁸.

Os resultados do perfil glicêmico demonstraram que a glicemia de jejum foi superior no grupo HF $\oplus$ sobrepeso em comparação ao HF $\oplus$ magro, sendo esta a única alteração identificada exclusivamente no grupo HF $\oplus$ do presente estudo. Este achado associado às outras alterações laboratoriais encontradas nos dois grupos com sobrepeso, que incluíram maiores níveis de LDL e leptina, pode fornecer evidências de que, neste caso, indivíduos com HF $\oplus$ e sobrepeso possuem um ambiente metabólico mais susceptível à promoção de alterações vasculares. A hiperglicemia inibe a eNOS e induz estresse oxidativo em células endoteliais e células musculares lisas vasculares, o que inativa o NO e promove síntese de peroxinitrito ⁴. No entanto, é importante ressaltar que apesar de maiores em relação ao HF $\oplus$ magro, os níveis de glicose no grupo HF $\oplus$ sobrepeso estiveram dentro dos limites de normalidade, ou seja, menor que 100 mg/dL, concentração esta que parece não provocar disfunção endotelial. Gomes e cols ¹⁷⁹ encontraram uma menor resposta vasodilatadora da microcirculação renal exposta a uma concentração de 11mM de glicose (200 mg/dL) em modelo animal; no entanto, a vasodilatação dependente de endotélio nos rins e em anéis de aorta não foi alterada após incubação com 7 mM de glicose (126 mg/dL). Em humanos foi observada uma diminuição da resposta vasodilatadora endotelial durante hiperglicemia aguda quando foi utilizada uma concentração supra-fisiológica de glicose (300 mg/dL) ¹⁸⁰.

A descoberta em 1994 da produção de leptina pelo gen *ob* dos adipócitos ¹⁸¹ representou um importante avanço na compreensão da relação entre o tecido adiposo como um órgão endócrino e o desenvolvimento das complicações da obesidade, incluindo o diabetes e as doenças cardiovasculares. Diversas ações da leptina são atribuídas aos seus efeitos no hipotálamo ao se ligar à principal isoforma do seu receptor, o Ob-Rb, estimulando a secreção de neuropeptídeos com ação anorexígena (pró-opiomelanocortina) e suprimindo a ação de neuropeptídeos estimuladores do apetite (neuropeptídeo Y). Desta forma, uma das funções da leptina é ser uma aferência para o sistema nervoso central dentro de uma

alça de retroalimentação negativa que regula a massa de tecido adiposo ¹⁸². Os níveis séricos deste hormônio no período pós-prandial sinalizam ao sistema nervoso central de que os estoques de gordura corporal foram restabelecidos, o que provoca uma inibição da ingesta alimentar enquanto no jejum os níveis de leptina caem, o que estimula o apetite e reduz o gasto energético ¹⁸². A adiposidade, os níveis de insulina e o gênero são os principais determinantes da produção desta adipocitocina. Mulheres produzem cerca de duas vezes mais leptina em comparação aos homens, independente da idade, raça e níveis de gordura corporal ¹⁶⁸. Esta diferença parecer ser atribuída aos hormônios sexuais, onde o estrogênio modula e estimula a expressão de leptina ¹⁶⁹ e também à maior distribuição de gordura sub-cutânea no sexo feminino, principal sítio de produção desta adipocitocina. A insulina regula a expressão do gene *ob* em adipócitos e indiretamente modula a produção de leptina ^{181, 183}. Desta forma, os dois hormônios interagem na manutenção da homeostase energética, onde o aumento da secreção de insulina, por exemplo no período pós-prandial, estimularia o tecido adiposo a produzir leptina, a qual atuaria no centro da saciedade. Por sua vez, a inibição do neuropeptídeo Y reduziria a secreção de insulina, o que causa diminuição dos níveis de leptina, a qual também pode agir diretamente nas células beta pancreáticas inibindo a produção de insulina ¹⁸⁴. A resistência insulínica promove hiperleptinemia, resposta esta que é intensificada por um aumento dos depósitos de gordura corporal ¹⁸⁵. A leptina é produzida em proporção aos estoques de gordura corporal e na obesidade as concentrações deste hormônio estão elevadas em resposta a um aumento no tamanho e no número de adipócitos assim como a maior produção do hormônio por unidade de gordura corporal ¹⁸⁶. Paralelamente, as alterações metabólicas causadas pela obesidade, incluindo os níveis elevados de citocinas inflamatórias como o TNF-alfa, influenciam diretamente o tecido adiposo a aumentar a produção de leptina. Ou seja, a hiperleptinemia é resultante de um aumento do tecido gorduroso, da hiperinsulinemia e do estímulo de adipocitoninas inflamatórias. No entanto, da mesma forma que o obeso desenvolve resistência insulínica, a hiperleptinemia é acompanhada de uma resistência à ação deste hormônio ¹⁸⁷. Os mecanismos da resistência à leptina ainda não estão completamente

esclarecidos mas incluem uma falha da leptina circulante em atingir seus receptores no cérebro, possivelmente por uma diminuição na atividade de seus transportadores, ou por uma inibição da cascata de sinalização intracelular do Ob-Rb ¹⁸⁸.

No presente estudo, os grupos com sobrepeso apresentaram maiores concentrações de leptina, a qual esteve correlacionada com os níveis de insulina de jejum e com o fator sexo feminino. Os resultados do grupo HF $\oplus$ sobrepeso foram semelhantes aos do grupo HF $\ominus$ sobrepeso, o que sugere que este efeito não tenha sido provocado pelo fator histórico familiar de DM2 e sim pelo sobrepeso. Considerando que não houve diferença estatisticamente significativa no número de voluntários do sexo feminino entre os grupos, o fator gênero parece não ser responsável pelos resultados encontrados. Quanto ao fator idade, não há um consenso quanto ao seu efeito sobre os níveis de leptina, podendo não exercer qualquer efeito ¹⁸⁹, provocar diminuição ¹⁹⁰ ou aumento em idades avançadas quando associado ao ganho de gordura corporal ¹⁹¹. Outros estudos ^{166, 192} demonstraram que indivíduos HF $\oplus$ apresentam valores superiores de leptina em comparação ao grupo de referência (HF $\ominus$). No entanto os voluntários avaliados no grupo HF $\oplus$ apresentavam resistência insulínica e os resultados de hiperleptinemia nos parentes estiveram correlacionados com a sensibilidade à insulina, independente do histórico familiar e percentual de gordura corporal. No estudo atual não houve diferença entre os quatro grupos avaliados quanto à insulina de jejum ou a AUC de insulina durante o TOTG.

O estresse de cisalhamento representa um dos estímulos mecânicos para produção de NO pelo endotélio. No entanto, o fluxo laminar pulsátil promove uma geração basal de NO, resultando em um tônus vasodilatador fisiológico que é essencial para a regulação do fluxo sanguíneo e da pressão arterial e para tamponar a ação de vasoconstritores endógenos ou exógenos ². A hiperemia reativa é utilizada na investigação da reatividade vascular como um estímulo para vasodilatação dependente de endotélio. Mas é importante ressaltar que além da produção de NO pelas células endoteliais, alterações metabólicas e mecanismos miogênicos contribuem para a resposta vasodilatadora após a isquemia

tecidual ¹⁹³. Independente do grau de participação de mediadores endoteliais, a resposta à hiperemia reativa como uma medida de reatividade vascular tem sido utilizada com valor prognóstico, onde uma maior resposta vasodilatadora está associada com menor número de eventos cardiovasculares em diferentes condições ¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Os resultados dos testes de reatividade vascular no presente estudo demonstraram que a resposta à hiperemia reativa foi maior nos voluntários com sobrepeso, não havendo diferença quanto à condição histórico familiar de DM2. Enquanto o fluxo sanguíneo de repouso foi semelhante entre os grupos, a resposta máxima, assim como o excesso de fluxo na HR foram superiores nos grupos com sobrepeso (HF $\oplus$ e HF $\ominus$) em relação aos seus respectivos grupos magros. Apesar da condutância vascular ter aumentado durante a HR, os resultados foram semelhantes entre os grupos HF $\oplus$ sobrepeso e HF $\ominus$ sobrepeso. Os estudos que avaliaram a reatividade vascular em indivíduos com histórico familiar de DM2 encontraram uma menor vasodilatação dependente de endotélio ¹³² ou uma resposta vasodilatadora prejudicada apenas quando associada à resistência insulínica ³⁷ ou não identificaram qualquer alteração ^{145, 156, 157}. O achado de que voluntários adultos jovens com sobrepeso, nos quais as variáveis do perfil glicêmico ou lipídico estão dentro dos limites de normalidade, apresentam uma maior reatividade vascular é intrigante. A fisiopatologia da obesidade e suas complicações reúne alguns fenômenos dinâmicos de respostas compensatórias que antecedem um quadro de disfunção. Apesar destes mecanismos estarem bem esclarecidos na hiperinsulinemia compensatória da história natural do DM2 ou na hiperfiltração glomerular nos estágios iniciais da doença, não há relatos na literatura quanto a uma possível resposta compensatória da reatividade vascular que anteceda a disfunção endotelial identificada em indivíduos obesos ou naqueles sob risco de desenvolver DM2, como os familiares de diabéticos.

A leptina em concentrações fisiológicas promove uma resposta vasodilatadora ao se ligar ao seu receptor ObRb em células endoteliais da circulação periférica ou coronariana ^{197, 198}. Apesar da leptina promover um aumento do tônus simpático, seu efeito no controle da pressão arterial seria resultante de um balanço entre a ativação do sistema nervoso

simpático mediado pelo hormônio e seu efeito hipotensor através do endotélio ^{199, 200}. Diversos estudos sugerem que a vasodilatação provocada pela leptina é mediada pelo NO endotelial ¹⁹⁹⁻²⁰⁵, enquanto outros sugerem que o mecanismo seja endotelial, mas independente de NO ^{197, 206, 207} ou independente de endotélio e de NO ²⁰⁸. Lembo e cols ²⁰⁰ descreveram mecanismos distintos para a vasodilatação à leptina, onde em vasos de condução esta resposta seja via NO e em vasos de resistência seja dependente de EDHF. De fato, em artérias de condutância, o NO é o mediador hierarquicamente mais importante da vasodilatação dependente de endotélio ²⁰⁹. Por outro lado, em pequenas artérias e arteríolas, o mecanismo hierarquicamente predominante de vasodilatação mediada pelo endotélio é dependente do EDHF ²⁰⁹. O NO inibe a síntese e/ou a liberação de EDHF, mas em estados de disfunção endotelial, nos quais a bioatividade do NO está reduzida, há um aumento do mecanismo vasodilatador dependente de EDHF ²¹⁰. Este fato representa um importante mecanismo compensatório que garante, ao menos em parte, a manutenção da função vasodilatadora endotelial quando a atividade do NO estiver prejudicada. Em modelos animais, o diabetes ou a hipercolesterolemia seletivamente diminuem a produção de NO em resposta a vários vasodilatadores dependente de endotélio como a acetilcolina, mas os mecanismos de produção do EDHF estão mantidos e aumentados ²¹¹⁻²¹³. Um estudo recente confirma estes achados relacionado-os com as respostas hemodinâmicas à leptina ²⁰¹. Animais alimentados com uma dieta hipercalórica durante um mês apresentaram menor produção de NO em resposta a administração aguda de leptina, mas sem alteração da pressão arterial. Este efeito foi abolido após a administração de um bloqueador de EDHF, sugerindo que o efeito vasodilatador da leptina é compensado pelo EDHF quando a síntese de NO está comprometida. Nos animais que receberam a dieta hipercalórica durante três meses, a leptina causou um aumento da pressão arterial em função de um menor efeito deste hormônio sobre a produção de NO e EDHF. Neste caso, a resposta de aumento do tônus simpático induzida pela leptina se sobrepõe, resultando em um efeito hipertensivo. Apesar do EDHF ser mais resistente às espécies reativas de oxigênio e à hiperleptinemia, sua resposta está diminuída em modelos de síndrome metabólica, caracterizados por

resistência insulínica, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia ^{214, 215}. Ou seja, frente à manutenção dos efeitos deletérios inerentes à obesidade, a resposta vasodilatadora é progressivamente comprometida até que o quadro de disfunção seja finalmente estabelecido. A partir destes achados surge a hipótese de que, no presente estudo, a maior resposta vasodilatadora encontrada nos indivíduos com sobrepeso (HF $\oplus$ ou HF $\ominus$) possa representar um mecanismo de compensação vascular com uma provável participação da leptina, onde nos estágios iniciais da obesidade observa-se um aumento da atividade vasodilatadora. No entanto, não é possível afirmar se este efeito ocorre através da síntese de NO induzida pela leptina ou se é mediado por outras substâncias, como o EDHF. Embora a leptina possa ter efeitos estimulantes sobre a homeostase vascular, a crescente produção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo na obesidade estimula ainda mais a síntese deste hormônio e em associação à alterações do perfil glicêmico e lipídico culmina com um quadro de hiperleptinemia acompanhado de uma resistência à sua ação. A hiperleptinemia crônica é capaz de causar disfunção endotelial ao estimular o acúmulo de lipoproteínas no espaço sub-endotelial, aumentar o acúmulo de ésteres de colesterol nas células espumosas, especialmente em altas concentrações de glicose, estimular o acúmulo de ROS e promover agregação plaquetária, migração e proliferação de células musculares lisas vasculares ²¹⁶. Portanto, a participação da leptina na disfunção endotelial e provavelmente no quadro de hipertensão arterial do obeso estaria relacionada à sua secreção cronicamente aumentada bem como uma resistência à sua ação. Estes fatores em conjunto com as demais alterações metabólicas provocadas pela obesidade, potencializariam o risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

3.7 CONCLUSÕES

Indivíduos adultos jovens com história familiar de DM2 não apresentam alteração da reatividade vascular quando comparado a um grupo controle sem história familiar de DM2 e pareado quanto ao peso, idade e sexo. Quando estratificados por IMC, indivíduos com sobrepeso, parentes e não parentes, apresentam maiores níveis de LDL e leptina, além de uma reatividade vascular aumentada. Estes achados sugerem que nos estágios iniciais do sobrepeso possa haver um mecanismo de compensação vascular, caracterizado por um aumento da resposta vasodilatadora e que pode progredir para disfunção endotelial quando a expressão dos fatores de agressão vascular se mantenha cronicamente aumentado.

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reatividade vascular tem se mostrado um importante preditor de risco cardiovascular. Pacientes com menor resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio, independente do método de avaliação utilizado, apresentam maior número de eventos cardiovasculares, como isquemia miocárdica ou angina instável ¹⁰. Muito embora a reatividade vasodilatadora dependa da integração entre fatores endoteliais, vasculares e autonômicos, estes achados reforçam o conceito de que alterações na função endotelial estão relacionadas aos estágios iniciais da doença cardiovascular e afirmam a importância de investigar não apenas pacientes portadores de tais doenças, como também indivíduos que possuem fatores de risco para desenvolvê-la. A obesidade e o diabetes são dois importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares. O tecido adiposo passou da condição de mero depósito de gordura para a de um importante e ativo órgão endócrino, capaz de secretar substâncias com ação sobre o metabolismo glicídico, lipídico e também sobre a função endotelial. As complicações macrovasculares por sua vez, dentre elas a arteriosclerose, são a principal causa de morte em pacientes diabéticos ³². Indivíduos com história familiar de DM2 e determinados grupos étnicos, como a população hispana, apresentam maior risco de desenvolver a doença, o que está associado a fatores genéticos e ambientais. Os resultados de diversos estudos que avaliaram indivíduos sob risco de DM2 convergem para uma conclusão única de que a obesidade seria um elo importante entre os fatores ambientais e os fatores genéticos, onde o aumento no percentual de gordura corporal potencializa ou acelera o aparecimento de alterações metabólicas e vasculares. Neste contexto, os experimentos realizados nesta tese tiveram como objetivo avaliar a reatividade vascular e a função endotelial de crianças e adolescentes hispanas e indivíduos com história familiar de DM2.

No primeiro experimento, crianças e adolescentes hispanas com maior percentual de gordura corporal apresentaram níveis elevados de insulina de jejum, triglicerídeos e índice

HOMA, o que sugere que este grupo possuía maior grau de resistência insulínica em comparação aos controles. Foram encontradas concentrações elevadas de marcadores de função endotelial, incluindo PCR, sVCAM, TNF-alfa e menor concentração de adiponectina no grupo SR. A vasodilatação dependente de endotélio foi maior nas crianças e adolescentes obesas, embora estudos anteriores tenham encontrado disfunção endotelial em população infanto-juvenil obesa de diferentes grupos étnicos ^{39, 40}. No segundo experimento, foram avaliados parentes de primeiro grau de pacientes com DM2 pareados ao grupo controle para variáveis que possuem influência sobre a reatividade vascular, como IMC, sexo, idade e excluindo voluntários com dislipidemia severa e intolerância à glicose. Os níveis de marcadores de função endotelial avaliados (sVCAM, PCR e adiponectina) no grupo HF $\oplus$ foram semelhantes ao HF $\ominus$, apesar da leptina tender a ser maior no grupo de familiares, mas sem significância estatística. A resposta vasodilatadora durante a hiperemia reativa e prensão manual também foi semelhante entre os grupos, sugerindo que a disfunção endotelial em indivíduos com história familiar de DM2 seja dependente de alterações metabólicas. Posteriormente, ao estratificar os grupos de acordo com o IMC, foram identificados nos indivíduos com sobrepeso (HF $\oplus$ e HF $\ominus$) níveis elevados de LDL e leptina além de uma maior resposta vasodilatadora. O achado comum de maior responsividade vascular em indivíduos acima do peso nos dois experimentos despertou para possibilidade de identificação de uma fase nova e precoce no desenvolvimento da doença cardiovascular.

A homeostase é, conceitualmente, a capacidade do organismo em manter sua estabilidade interna. Quando há um distúrbio na homeostase, seja por doenças com causas internas (como desordens hereditárias) ou externas (como infecções por vírus ou bactérias), observa-se uma resposta compensatória do organismo. Se esta compensação é bem sucedida, a homeostase é restabelecida; caso contrário, resulta em doença ²¹⁷. Portanto, é comum encontrar mecanismos compensatórios na fisiopatologia de diferentes doenças, o que representa uma tentativa do organismo de manter a homeostase e antecede o quadro de disfunção propriamente dita. Um exemplo é a fisiopatologia do DM2, a qual engloba

diferentes tipos de mecanismos compensatórios. Como citado anteriormente, um dos principais fatores de risco para o DM2 é a obesidade. A hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos promove a secreção aumentada de adipocitocinas como a leptina, TNF-alfa e interleucina-6, que diminuem a sensibilidade à insulina, além de provocar alterações vasculares. Nesta fase, observa-se uma maior produção de insulina pelas células beta pancreáticas, como parte de um mecanismo compensatório capaz de manter os níveis glicêmicos dentro da faixa de normalidade (figura 10). Uma vez que os fatores causais sejam cronicamente mantidos, ou seja, a maior produção de adipocitocinas, as células beta se tornam incapazes de manter a hipersecreção de insulina e entram em falência. Logo, as concentrações de insulina diminuem consideravelmente em paralelo ao aumento da glicemia, caracterizando o DM2. A fisiopatologia da nefropatia diabética também é caracterizada por um mecanismo compensatório de hiperfiltração glomerular, onde nas fases iniciais os mecanismos que aumentam a disponibilidade de NO nos rins prevalecem. Com a progressão temporal da doença, os fatores que suprimem a biodisponibilidade de NO gradualmente predominam e a falência renal é finalmente estabelecida ¹²⁸.

A hipótese apresentada a partir dos experimentos realizados nesta tese é de que exista um mecanismo compensatório endotelial, caracterizado por um aumento da resposta vasodilatadora anterior ao desenvolvimento da disfunção das células endoteliais na obesidade. Neste contexto, a leptina e a insulina parecem ser mediadoras desta hiperreatividade vascular. As concentrações de leptina aumentam em proporção ao ganho de gordura corporal. Em níveis fisiológicos, a leptina possui efeito vasodilatador através de mecanismo ainda não completamente esclarecido, mas que se sugere ser via NO endotelial ²¹⁸. Da mesma forma, a insulina é capaz de promover o relaxamento da musculatura lisa vascular ao estimular a produção de NO pelo endotélio ²¹⁹. A sensibilidade à insulina assim como a sensibilidade à leptina são determinantes de seus efeitos vasculares. Com a evolução temporal do sobrepeso/obesidade, a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia progridem para um quadro de resistência às suas respectivas atividades. A hiperleptinemia crônica, por sua vez, potencializa ainda mais a resistência insulínica. Neste momento, há

uma perda do efeito vasodilatador destas duas substâncias, provavelmente por um aumento do tônus simpático provocado pela leptina e um aumento do estresse oxidativo e menor biodisponibilidade de NO causado pela insulina ¹²³, sendo o efeito comum uma agressão à integridade do endotélio com perda progressiva da sua função.

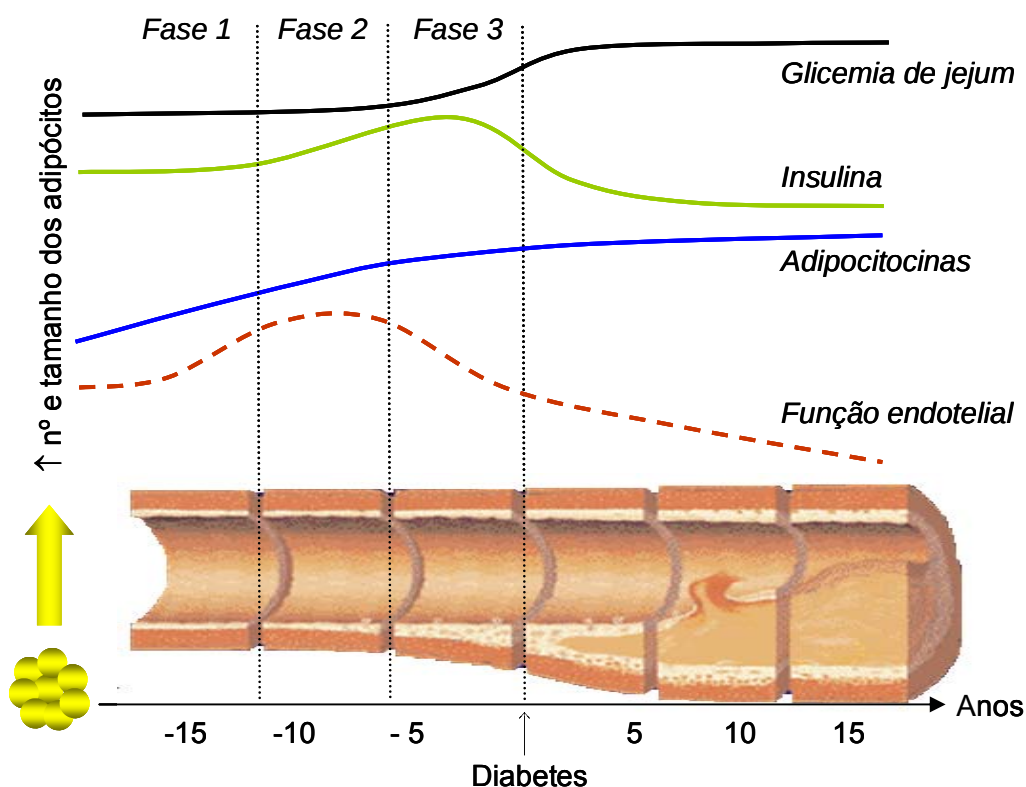


Figura 10: Fisiopatologia das alterações macrovasculares no sobrepeso/obesidade associando novas hipóteses de hiperatividade endotelial na fase pré-diabetes. Adaptado de Rickheim e cols ²²⁰.

Portanto, sugere-se que exista três fases na progressão da disfunção endotelial causada pela obesidade: (1) aumento da secreção de adipocitocinas e maior resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio, com participação da leptina; (2) hiperinsulinemia compensatória causada pela maior concentração de adipocitocinas, especialmente a leptina e vasodilatação endotélio dependente aumentada por ação da leptina e da insulina; (3) hiperleptinemia e hiperinsulinemia crônica associadas à resistência insulínica e resistência à

leptina causando diminuição da resposta vasodilatadora endotelial. Os indivíduos com sobrepeso avaliados no estudo II estariam na primeira fase, onde os níveis de glicemia e insulina se mantêm dentro do limite de normalidade e a leptina parece ser um importante mediador da maior atividade vasodilatadora endotelial. As crianças e adolescentes hispanos obesos avaliados no estudo I estariam na segunda fase, onde já se observa maior secreção de insulina e de adipocitocinas. Apesar de não ter sido realizada a dosagem de leptina no estudo I é provável que seus níveis estivessem elevados, assim como as demais adipocitocinas que foram avaliadas. Juntamente com a insulina, a hiperleptinemia poderia estar contribuindo para a hiperatividade endotelial.

Acredita-se que, além da leptina e da insulina, outros mediadores que não foram avaliados nestes estudos estejam envolvidos na resposta compensatória endotelial. Também é possível que, além do NO, outros agentes produzidos pelo endotélio possam estar agindo na musculatura lisa vascular. Modelos animais demonstraram que a produção de EDHF é intensificada em situações onde a produção de NO esteja comprometida, representando mais um exemplo de mecanismo compensatório sistêmico ²¹¹⁻²¹³. Estudos longitudinais são necessários para a confirmação da presente hipótese e, neste caso, compreensão dos mecanismos e mediadores envolvidos. Com a progressão temporal, espera-se que estes indivíduos evoluam para a terceira fase, onde há uma diminuição da resposta vasodilatadora endotelial já demonstrada na literatura. O uso de bloqueadores da leptina e da NOS poderiam confirmar a hipótese da possível participação deste hormônio e do NO na fase de hiperatividade endotelial. Desta forma, o conhecimento da história natural da disfunção endotelial na obesidade poderia orientar abordagens terapêuticas e preventivas mais eficazes a cada fase no sentido de diminuir a incidência de diabetes e suas complicações, contribuindo assim para aumentar a qualidade de vida e a longevidade da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288(5789):373-6.
2. Carvalho M, Fortes Z, Passaglia R, Nigro D. Funções normais do endotélio. In: Luz PL, ed. *Endotélio e doenças de cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003:17 - 32.
3. Nascimento C, Patriarca G, Heimann J. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Luz PLd, ed. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003:1 - 16.
4. da Luz P, Uint L. Endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade. In: Luz PLd, ed. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003:133 - 60.
5. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002;90(10C):40L-8L.
6. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res* 2000;87(7):566-73.
7. Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *Faseb J* 2003;17(10):1289-91.
8. Serrano-Jr C, Fernandes J, da Luz P. Moléculas de adesão, inflamação e endotélio. In: Luz PLd, ed. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003:97 - 113.
9. Pedro M, Coimbra S, Consolim-Colombo F. Métodos de investigação do endotélio. In: Luz PLd, ed. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003:53 - 68.
10. Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol* 2003;91(12A):19H-24H.
11. Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004;291(16):1978-86.
12. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003;108(16):1917-23.
13. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* 2003;108(17):2041-8.
14. Higashi Y, Yoshizumi M. New methods to evaluate endothelial function: method for assessing endothelial function in humans using a strain-gauge plethysmography: nitric oxide-dependent and -independent vasodilation. *J Pharmacol Sci* 2003;93(4):399-404.
15. Trombetta IC, Batalha LT, Rondon MU, Laterza MC, Kuniyoshi FH, Gowdak MM, et al. Weight loss improves neurovascular and muscle metaboreflex control in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(3):H974-82.
16. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(2):257-65.
17. Avogaro A, de Kreutzenberg SV. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* 2005;360(1-2):9-26.
18. Saydah SH, Eberhardt MS, Loria CM, Brancati FL. Age and the burden of death attributable to diabetes in the United States. *Am J Epidemiol* 2002;156(8):714-9.
19. Salles GF, Bloch KV, Cardoso CR. Mortality and predictors of mortality in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004;27(6):1299-305.
20. Sociedade Brasileira de Diabetes [site da internet]. Rio de Janeiro: Consenso brasileiro sobre diabetes; 2003 [acessado em 07/04/2006]. Disponível em <http://www.diabetes.org.br>
21. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29(suppl1):S43-8.
22. 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* 2004;27(5):1047-53.
23. World Health Organization [site da internet]. Geneva: Diet, nutrition and prevention of chronic disease; 2003 [acessado em 07/03/2006]. Disponível em <http://www.who.int/nutrition/>
24. Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA* 2004;291(23):2847-50.
25. Juge-Aubry CE, Somm E, Pernin A, Alizadeh N, Giusti V, Dayer JM, et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. *Cytokine* 2005;29(6):270-4.

26. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115(5):1111-9.
27. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation* 2006;113(7):e152-5.
28. Pasceri V, Willerson J, Yeh E. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165-8.
29. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106(8):913-9.
30. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49(11):1939-45.
31. Sorescu D, Szocs K, Griendling KK. NAD(P)H oxidases and their relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11(3-4):124-31.
32. Powers AC. Diabetes melito. In: Eugene Braunwald ASF, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, ed. *Medicina interna*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2002:2240 - 71.
33. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res* 2003;11(11):1278-89.
34. Haffner SM, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK, Stern MP. Increased incidence of type II diabetes mellitus in Mexican Americans. *Diabetes Care* 1991;14(2):102-8.
35. Hamman RF, Marshall JA, Baxter J, Kahn LB, Mayer EJ, Orleans M, et al. Methods and prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in a biethnic Colorado population. The San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol* 1989;129(2):295-311.
36. Mitchell BD, Stern MP, Haffner SM, Hazuda HP, Patterson JK. Risk factors for cardiovascular mortality in Mexican Americans and non-Hispanic whites. San Antonio Heart Study. *Am J Epidemiol* 1990;131(3):423-33.
37. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000;101(15):1780-4.
38. Goran MI, Bergman RN, Avila Q, Watkins M, Ball GD, Shaibi GQ, et al. Impaired glucose tolerance and reduced beta-cell function in overweight Latino children with a positive family history for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(1):207-12.
39. Ribeiro MM, Silva AG, Santos NS, Guazzelle I, Matos LN, Trombetta IC, et al. Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological maneuvers in obese children. *Circulation* 2005;111(15):1915-23.
40. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, et al. Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children. *Circulation* 2004;109(16):1981-6.
41. United States Census Bureau [site da internet]. Washington: The hispanic population in the United States; 2002 [acessado em 07/04/2006]. Disponível em <http://www.census.gov>
42. Burchfiel CM, Hamman RF, Marshall JA, Baxter J, Kahn LB, Amirani JJ. Cardiovascular risk factors and impaired glucose tolerance: the San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol* 1990;131(1):57-70.
43. Fagot-Campagna A, Narayan K. Type 2 diabetes in children. *Br Med J* 2001;322:377 – 87.
44. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414(6865):782-7.
45. Goran MI, Ball GD, Cruz ML. Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(4):1417-27.
46. Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, Standiford D, Khoury PR, Zeitler P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr* 1996;128(5 Pt 1):608-15.
47. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96(9):939-49.
48. Fagot-Campagna A NK. Type 2 diabetes in children. *Br Med J* 2001;322:377 – 87.
49. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340(8828):1111-5.

50. Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, et al. Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study. *Lancet* 2001;358(9291):1400-4.
51. Goran MI, Bergman RN, Cruz ML, Watanabe R. Insulin resistance and associated compensatory responses in african-american and Hispanic children. *Diabetes Care* 2002;25(12):2184-90.
52. Elhadd TA, Khan F, Kirk G, McLaren M, Newton RW, Greene SA, et al. Influence of puberty on endothelial dysfunction and oxidative stress in young patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1998;21(11):1990-6.
53. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation* 2004;109(14):1750-5.
54. Pomilio M, Mohn A, Verrotti A, Chiarelli F. Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15(4):343-61.
55. Centers for Disease Control [site da internet]. United States: 2000 CDC Growth Charts; 2000 [acessado em 01/03/2006]. Disponível em <http://www.cdc.gov/growthcharts/>
56. National Cholesterol Education Program. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106(25):3143-421.
57. National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42(6):1206 -52.
58. Tanner J. Growth at adolescent. 2^a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1962.
59. Friedewald W, Levi R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-52.
60. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412-9.
61. Bachrach LK. Dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) measurements of bone density and body composition: promise and pitfalls. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13 Suppl 2:983-8.
62. Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, et al. Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 2005;111(15):1999-2012.
63. Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 2001;108(3):712-8.
64. Lauer RM, Clarke WR. Childhood risk factors for high adult blood pressure: the Muscatine Study. *Pediatrics* 1989;84(4):633-41.
65. Lauer RM, Lee J, Clarke WR. Factors affecting the relationship between childhood and adult cholesterol levels: the Muscatine Study. *Pediatrics* 1988;82(3):309-18.
66. McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, et al. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation* 2002;105(23):2712-8.
67. Kobaiissi HA, Weigensberg MJ, Ball GD, Cruz ML, Shaibi GQ, Goran MI. Relation between acanthosis nigricans and insulin sensitivity in overweight Hispanic children at risk for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(6):1412-6.
68. Batey LS, Goff DC, Jr., Tortolero SR, Nichaman MZ, Chan W, Chan FA, et al. Summary measures of the insulin resistance syndrome are adverse among Mexican-American versus non-Hispanic white children: the Corpus Christi Child Heart Study. *Circulation* 1997;96(12):4319-25.
69. Gower BA, Granger WM, Franklin F, Shewchuk RM, Goran MI. Contribution of insulin secretion and clearance to glucose-induced insulin concentration in african-american and caucasian children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(5):2218-24.
70. Weiss R, Dziura JD, Burgert TS, Taksali SE, Tamborlane WV, Caprio S. Ethnic differences in beta cell adaptation to insulin resistance in obese children and adolescents. *Diabetologia* 2006;49(3):571-9.
71. Conwell LS, Trost SG, Brown WJ, Batch JA. Indexes of insulin resistance and secretion in obese children and adolescents: a validation study. *Diabetes Care* 2004;27(2):314-9.
72. Tresaco B, Bueno G, Pineda I, Moreno LA, Garagorri JM, Bueno M. Homeostatic model assessment (HOMA) index cut-off values to identify the metabolic syndrome in children. *J Physiol Biochem* 2005;61(2):381-8.

73. Sharp TA, Grunwald GK, Giltinan KE, King DL, Jatkauskas CJ, Hill JO. Association of anthropometric measures with risk of diabetes and cardiovascular disease in Hispanic and Caucasian adolescents. *Prev Med* 2003;37(6 Pt 1):611-6.
74. Cruz ML, Bergman RN, Goran MI. Unique effect of visceral fat on insulin sensitivity in obese Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(9):1631-6.
75. Srinivasan SR, Myers L, Berenson GS. Temporal association between obesity and hyperinsulinemia in children, adolescents, and young adults: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 1999;48(7):928-34.
76. Ten S, Maclaren N. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2526-39.
77. Steinberger J, Daniels SR. Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). *Circulation* 2003;107(10):1448-53.
78. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002;43(12):1997-2006.
79. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 2005;36(3):232-40.
80. Hall JE, Brands MW, Henegar JR. Mechanisms of hypertension and kidney disease in obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:91-107.
81. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998;338(23):1650-6.
82. Amiel SA, Sherwin RS, Simonson DC, Lauritano AA, Tamborlane WV. Impaired insulin action in puberty. A contributing factor to poor glycemic control in adolescents with diabetes. *N Engl J Med* 1986;315(4):215-9.
83. Bloch CA, Clemons P, Sperling MA. Puberty decreases insulin sensitivity. *J Pediatr* 1987;110(3):481-7.
84. Caprio S, Plewe G, Diamond MP, Simonson DC, Boulware SD, Sherwin RS, et al. Increased insulin secretion in puberty: a compensatory response to reductions in insulin sensitivity. *J Pediatr* 1989;114(6):963-7.
85. Caprio SJ, J. Tamborlane, W. Developmental changes in insulin action and secretion in childhood health and disease. *Adv Endocrinol Metab* 1994;5:171-201.
86. Moran A, Jacobs DR, Jr., Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, et al. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes* 1999;48(10):2039-44.
87. Travers SH, Jeffers BW, Bloch CA, Hill JO, Eckel RH. Gender and Tanner stage differences in body composition and insulin sensitivity in early pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(1):172-8.
88. Ball GD, Huang TT, Gower BA, Cruz ML, Shaibi GQ, Weigensberg MJ, et al. Longitudinal changes in insulin sensitivity, insulin secretion, and beta-cell function during puberty. *J Pediatr* 2006;148(1):16-22.
89. Ball GD, Weigensberg MJ, Cruz ML, Shaibi GQ, Kobaissi HA, Goran MI. Insulin sensitivity, insulin secretion and beta-cell function during puberty in overweight Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 2005;29(12):1471-7.
90. Goran MI, Gower BA. Longitudinal study on pubertal insulin resistance. *Diabetes* 2001;50(11):2444-50.
91. Merimee TB, JA. Rabinowitz, D. Influence of growth hormone on insulin secretion. *Diabetes* 1967;16:478-82.
92. Nielsen J. Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. *Endocrinology* 1982;110:600-6.
93. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2583-9.
94. Balagopal P, George D, Patton N, Yarandi H, Roberts WL, Bayne E, et al. Lifestyle-only intervention attenuates the inflammatory state associated with obesity: a randomized controlled study in adolescents. *J Pediatr* 2005;146(3):342-8.
95. Gilardini L, McTernan PG, Girola A, da Silva NF, Alberti L, Kumar S, et al. Adiponectin is a candidate marker of metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Atherosclerosis* 2006 (in press).

96. Ford ES. C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Circulation* 2003;108(9):1053-8.
97. Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 2003;52(11):2784-9.
98. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002;51(12):3391-9.
99. Campos SP, Baumann H. Insulin is a prominent modulator of the cytokine-stimulated expression of acute-phase plasma protein genes. *Mol Cell Biol* 1992;12(4):1789-97.
100. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997;78(3):273-7.
101. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95(5):2409-15.
102. Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 1991;266(32):21839-45.
103. Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, et al. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor- α . *Mol Endocrinol* 1996;10(11):1457-66.
104. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271(5249):665-8.
105. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(3):1084-9.
106. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* 2005;6(1):13-21.
107. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108(12):1875-81.
108. Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. *Diabetes Care* 2004;27(2):547-52.
109. Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, et al. Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2014-8.
110. Butte NF, Comuzzie AG, Cai G, Cole SA, Mehta NR, Bacino CA. Genetic and environmental factors influencing fasting serum adiponectin in Hispanic children. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(7):4170-6.
111. McGill JB, Schneider DJ, Arfken CL, Lucore CL, Sobel BE. Factors responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects and NIDDM patients. *Diabetes* 1994;43(1):104-9.
112. Sudi KM, Gallistl S, Trobinger M, Payerl D, Weinhandl G, Muntean W, et al. The influence of weight loss on fibrinolytic and metabolic parameters in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(1):85-94.
113. Glowinska B, Urban M, Koput A, Galar M. New atherosclerosis risk factors in obese, hypertensive and diabetic children and adolescents. *Atherosclerosis* 2003;167(2):275-86.
114. Alessi MC, Juhan-Vague I, Kooistra T, Declercq PJ, Collen D. Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2. *Thromb Haemost* 1988;60(3):491-4.
115. Meigs JB, O'Donnell C J, Tofler GH, Benjamin EJ, Fox CS, Lipinska I, et al. Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2006;55(2):530-7.
116. Glowinska B, Urban M, Peczynska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism* 2005;54(8):1020-6.
117. Targher G, Bonadonna RC, Alberiche M, Zenere MB, Muggeo M, Bonora E. Relation between soluble adhesion molecules and insulin sensitivity in type 2 diabetic individuals: role of adipose tissue. *Diabetes Care* 2001;24(11):1961-6.
118. Watts K, Beye P, Siafarikas A, Davis EA, Jones TW, O'Driscoll G, et al. Exercise training normalizes vascular dysfunction and improves central adiposity in obese adolescents. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(10):1823-7.

119. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;105:1890 – 6.
120. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109(17):2058-67.
121. Verma S, Wang CH, Weisel RD, Badiwala MV, Li SH, Fedak PW, et al. Hyperglycemia potentiates the proatherogenic effects of C-reactive protein: reversal with rosiglitazone. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35(4):417-9.
122. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994;94(6):2511-5.
123. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation* 2002;105(5):576-82.
124. Scherrer U, Sartori C. Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* 1997;96(11):4104-13.
125. Caballero AE. Metabolic and vascular abnormalities in subjects at risk for type 2 diabetes: the early start of a dangerous situation. *Arch Med Res* 2005;36(3):241-9.
126. Serne EH, RG IJ, Gans RO, Nijveldt R, De Vries G, Evertz R, et al. Direct evidence for insulin-induced capillary recruitment in skin of healthy subjects during physiological hyperinsulinemia. *Diabetes* 2002;51(5):1515-22.
127. Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, et al. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes* 2004;53(6):1418-23.
128. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Allison KM, Anderson S. Role of neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the pathogenesis of renal hemodynamic changes in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(3):F573-83.
129. Komers R, Anderson S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284(6):F1121-37.
130. Silverthorn DU. Os rins. In: Silverthorn DU, ed. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 2ª ed. Barueri, SP: Manole; 2003:542-68.
131. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, et al. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(24):11993-7.
132. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48(9):1856-62.
133. Bougneres P. Genetics of obesity and type 2 diabetes: tracking pathogenic traits during the predisease period. *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S295-303.
134. Kahn CR, Vicent D, Doria A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 1996;47:509-31.
135. Rich SS. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. *Diabetes* 1990;39(11):1315-9.
136. Raeder H, Johansson S, Holm PI, Haldorsen IS, Mas E, Sbarra V, et al. Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction. *Nat Genet* 2006;38(1):54-62.
137. Mitchell BD, Zaccaro D, Wagenknecht LE, Scherzinger AL, Bergman RN, Haffner SM, et al. Insulin sensitivity, body fat distribution, and family diabetes history: the IRAS Family Study. *Obes Res* 2004;12(5):831-9.
138. Tripathy D, Lindholm E, Isomaa B, Saloranta C, Tuomi T, Groop L. Familiality of metabolic abnormalities is dependent on age at onset and phenotype of the type 2 diabetic proband. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285(6):E1297-303.
139. Humphriss DB, Stewart MW, Berrish TS, Barriocanal LA, Trajano LR, Ashworth LA, et al. Multiple metabolic abnormalities in normal glucose tolerant relatives of NIDDM families. *Diabetologia* 1997;40(10):1185-90.
140. Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes* 1997;46(6):1001-9.

141. Thamer C, Stumvoll M, Niess A, Tschritter O, Haap M, Becker R, et al. Reduced skeletal muscle oxygen uptake and reduced beta-cell function: two early abnormalities in normal glucose-tolerant offspring of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26(7):2126-32.
142. da Silva RC, Miranda WL, Chacra AR, Dib SA. Metabolic syndrome and insulin resistance in normal glucose tolerant brazilian adolescents with family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28(3):716-8.
143. Pimenta WP, Santos ML, Cruz NS, Aragon FF, Padovani CR, Gerich JE. Insulin secretion, insulin sensitivity, and hepatic insulin extraction in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(3):301-8.
144. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998;19(4):491-503.
145. McSorley PT, Bell PM, Young IS, Atkinson AB, Sheridan B, Fee JP, et al. Endothelial function, insulin action and cardiovascular risk factors in young healthy adult offspring of parents with Type 2 diabetes: effect of vitamin E in a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Diabet Med* 2005;22(6):703-10.
146. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(1):177-82.
147. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 1996;5(3):213-26.
148. Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, Oshiro Y, Takasu N. Fluvastatin improves endothelial dysfunction in overweight postmenopausal women through small dense low-density lipoprotein reduction. *Metabolism* 2004;53(6):733-9.
149. Moss M, Wellman DA, Cotsonis GA. An appraisal of multivariable logistic models in the pulmonary and critical care literature. *Chest* 2003;123(3):923-8.
150. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2000;49(12):2201-7.
151. Shaw JT, Purdie DM, Neil HA, Levy JC, Turner RC. The relative risks of hyperglycaemia, obesity and dyslipidaemia in the relatives of patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42(1):24-7.
152. Schumacher MC, Maxwell TM, Wu LL, Hunt SC, Williams RR, Elbein SC. Dyslipidemias among normoglycemic members of familial NIDDM pedigrees. *Diabetes Care* 1992;15(10):1285-9.
153. Srinivasan SR, Frontini MG, Berenson GS. Longitudinal changes in risk variables of insulin resistance syndrome from childhood to young adulthood in offspring of parents with type 2 diabetes: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 2003;52(4):443-50; discussion 51-3.
154. Nyholm B, Nielsen MF, Kristensen K, Nielsen S, Ostergard T, Pedersen SB, et al. Evidence of increased visceral obesity and reduced physical fitness in healthy insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Eur J Endocrinol* 2004;150(2):207-14.
155. Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, et al. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects. *Diabetes* 1996;45(11):1585-93.
156. Lee BC, Shore AC, Humphreys JM, Lowe GD, Rumley A, Clark PM, et al. Skin microvascular vasodilatory capacity in offspring of two parents with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2001;18(7):541-5.
157. Middlebrooke AR, Armstrong N, Welsman JR, Shore AC, Clark P, MacLeod KM. Does aerobic fitness influence microvascular function in healthy adults at risk of developing Type 2 diabetes? *Diabet Med* 2005;22(4):483-9.
158. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97(11):2601-10.
159. John S, Jacobi J, Schlaich MP, Delles C, Schmieder RE. Effects of oral contraceptives on vascular endothelium in premenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(1):28-33.
160. Merki-Feld GS, Rosselli M, Dubey RK, Jager AW, Keller PJ. Long-term effects of combined oral contraceptives on markers of endothelial function and lipids in healthy premenopausal women. *Contraception* 2002;65(3):231-6.
161. Viridis A, Pinto S, Versari D, Salvetti G, Bernini G, Fruzzetti F, et al. Effect of oral contraceptives on endothelial function in the peripheral microcirculation of healthy women. *J Hypertens* 2003;21(12):2275-80.

162. Pellme F, Smith U, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brekke H, Wiklund O, et al. Circulating adiponectin levels are reduced in nonobese but insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2003;52(5):1182-6.
163. Kriketos AD, Greenfield JR, Peake PW, Furler SM, Denyer GS, Charlesworth JA, et al. Inflammation, insulin resistance, and adiposity: a study of first-degree relatives of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2004;27(8):2033-40.
164. Lihn AS, Ostergaard T, Nyholm B, Pedersen SB, Richelsen B, Schmitz O. Adiponectin expression in adipose tissue is reduced in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284(2):E443-8.
165. McSorley PT, Young IS, McEneny J, Fee H, McCance DR. Susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation and circulating cell adhesion molecules in young healthy adult offspring of parents with type 2 diabetes. *Metabolism* 2004;53(6):755-9.
166. Nyholm B, Fisker S, Lund S, Moller N, Schmitz O. Increased circulating leptin concentrations in insulin-resistant first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: relationship to body composition and insulin sensitivity but not to family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 1997;136(2):173-9.
167. Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(6):2149-55.
168. Miller GD, Frost R, Olive J. Relation of plasma leptin concentrations to sex, body fat, dietary intake, and peak oxygen uptake in young adult women and men. *Nutrition* 2001;17(2):105-11.
169. Thomas T, Burguera B, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, et al. Relationship of serum leptin levels with body composition and sex steroid and insulin levels in men and women. *Metabolism* 2000;49(10):1278-84.
170. Hibbert B, Olsen S, O'Brien E. Involvement of progenitor cells in vascular repair. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13(8):322-6.
171. Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(4):698-703.
172. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103(9):1231-6.
173. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89(1):E1-7.
174. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001;294(5548):1933-6.
175. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(9):1449-57.
176. Ishikawa M, Pruneda ML, Adams-Huet B, Raskin P. Obesity-independent hyperinsulinemia in nondiabetic first-degree relatives of individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 1998;47(5):788-92.
177. Van Gaal LF, Vertommen J, De Leeuw IH. The in vitro oxidizability of lipoprotein particles in obese and non-obese subjects. *Atherosclerosis* 1998;137 Suppl:S39-44.
178. Carantoni M, Abbasi F, Warmerdam F, Klebanov M, Wang PW, Chen YD, et al. Relationship between insulin resistance and partially oxidized LDL particles in healthy, nondiabetic volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(5):762-7.
179. Gomes MB, Affonso FS, Cailleaux S, Almeida AL, Pinto LF, Tibirica E. Glucose levels observed in daily clinical practice induce endothelial dysfunction in the rabbit macro- and microcirculation. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18(3):339-46.
180. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 1998;97(17):1695-701.
181. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 1995;44(12):1467-70.
182. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-37.
183. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, et al. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 1996;45(5):699-701.

184. Saad MF, Khan A, Sharma A, Michael R, Riad-Gabriel MG, Boyadjian R, et al. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 1998;47(4):544-9.
185. Segal KR, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* 1996;45(7):988-91.
186. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 1996;45(7):984-7.
187. Ren J. Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 2004;181(1):1-10.
188. Münzberg HMJ, MG. Molecular and anatomical of central leptin resistance. *Nature Neuroscience* 2005;8(5):566-70.
189. Ma Z, Gingerich RL, Santiago JV, Klein S, Smith CH, Landt M. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clin Chem* 1996;42(6 Pt 1):942-6.
190. Ostlund RE, Jr., Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(11):3909-13.
191. Nystrom F, Ekman B, Osterlund M, Lindstrom T, Ohman KP, Arnqvist HJ. Serum leptin concentrations in a normal population and in GH deficiency: negative correlation with testosterone in men and effects of GH treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47(2):191-8.
192. Jansson PA, Eliasson B, Lindmark S, Eriksson JW. Endocrine abnormalities in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes patients--potential role of steroid hormones and leptin in the development of insulin resistance. *Eur J Clin Invest* 2002;32(3):172-8.
193. Joyner MJ, Dietz NM, Shepherd JT. From Belfast to Mayo and beyond: the use and future of plethysmography to study blood flow in human limbs. *J Appl Physiol* 2001;91(6):2431-41.
194. Chan SY, Mancini GB, 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* 2003;42(6):1037-43.
195. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(10):1769-75.
196. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol* 2000;86(2):207-10.
197. Matsuda K, Teragawa H, Fukuda Y, Nakagawa K, Higashi Y, Chayama K. Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. *Hypertens Res* 2003;26(2):147-52.
198. Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281(5383):1683-6.
199. Fruhbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 1999;48(4):903-8.
200. Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, et al. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes* 2000;49(2):293-7.
201. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A. Role of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the regulation of blood pressure by leptin in lean and obese rats. *Life Sci* 2006.
202. Kimura K, Tsuda K, Baba A, Kawabe T, Boh-oka S, Iyata M, et al. Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273(2):745-9.
203. Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN, Jr., Koshida R, Picchi A, et al. Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(1):H48-56.
204. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes* 2002;51(1):168-73.
205. Winters B, Mo Z, Brooks-Asplund E, Kim S, Shoukas A, Li D, et al. Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lep(ob)) mice. *J Appl Physiol* 2000;89(6):2382-90.
206. Nakagawa K, Higashi Y, Sasaki S, Oshima T, Matsuura H, Chayama K. Leptin causes vasodilation in humans. *Hypertens Res* 2002;25(2):161-5.
207. Schirmer SH, Buschmann IR, Jost MM, Hoefer IE, Grundmann S, Andert JP, et al. Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;64(2):356-64.

208. Momin AU, Melikian N, Shah AM, Grieve DJ, Wheatcroft SB, John L, et al. Leptin is an endothelial-independent vasodilator in humans with coronary artery disease: evidence for tissue specificity of leptin resistance. *Eur Heart J* 2006 (in press).
209. Laurindo F, Liberman M, Leite P. Substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio. In: Luz PLd, ed. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003:33 - 42.
210. Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 1996;94(12):3341-7.
211. Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Tare M, Parkington HC. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32(5-6):482-7.
212. Morikawa K, Matoba T, Kubota H, Hatanaka M, Fujiki T, Takahashi S, et al. Influence of diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and their combination on EDHF-mediated responses in mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45(5):485-90.
213. Triggle CR, Ding H, Anderson TJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. *Mol Cell Biochem* 2004;263(1-2):21-7.
214. Cooke CL, Davidge ST. Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovasc Res* 2003;60(3):635-42.
215. Katakam PV, Ujhelyi MR, Miller AW. EDHF-mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34(3):461-7.
216. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006 (in press).
217. Silverthorn D. Introdução à Fisiologia. In: Silverthorn D, ed. *Fisiologia humana*. 2ª ed. Barueri, SP: Manole; 2003:1-14.
218. Ritchie SA, Ewart MA, Perry CG, Connell JM, Salt IP. The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. *Clin Sci (Lond)* 2004;107(6):519-32.
219. Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 2000;101(13):1539-45.
220. Rickheim P, Flader J, Carstensen K. Type 2 Diabetes. In: *BASICS: A complete curriculum for diabetes education*. Minneapolis: International Diabetes Center; 2000.

ANEXOS

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](#)