

**ANTONELLA MÁRCIA MERCADANTE DE ALBUQUERQUE DO
NASCIMENTO**

Associação de disfunção endotelial com alterações estruturais iniciais de aterosclerose e presença de marcadores séricos sugestivos de inflamação, disfunção endotelial e injúria vascular em crianças portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1

BRASÍLIA – DF

2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Associação de disfunção endotelial com alterações estruturais iniciais de aterosclerose e presença de marcadores séricos sugestivos de inflamação, disfunção endotelial e injúria vascular em crianças portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1

ANTONELLA MÁRCIA MERCADANTE DE ALBUQUERQUE DO
NASCIMENTO

Brasília – DF

Novembro/2014

ANTONELLA MÁRCIA MERCADANTE DE ALBUQUERQUE DO
NASCIMENTO

Associação de disfunção endotelial com alterações estruturais iniciais de aterosclerose e presença de marcadores séricos sugestivos de inflamação, disfunção endotelial e injúria vascular em crianças portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof. Dr. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Brasília – DF

Novembro/2014

**ANTONELLA MÁRCIA MERCADANTE DE ALBUQUERQUE DO
NASCIMENTO**

Associação de disfunção endotelial com alterações estruturais iniciais de aterosclerose e presença de marcadores séricos sugestivos de inflamação, disfunção endotelial e injúria vascular em crianças portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1

Aprovado em 28/11/2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (Presidente)

Universidade de Brasília (UNB)

Profa. Dra. Angélica Amato Amorim (Membro)

Universidade de Brasília (UNB)

Profa. Dra. Simone Nascimento dos Santos (Membro)

Hospital Brasília - CTCV - DF

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Pediatria e Cardiologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), no Centro de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Centro de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônicas degenerativas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Dedico este trabalho a meus pais Cyro e Márcia, meu marido Freibergue, meus filhos Juliana e Leonardo e a todas as crianças portadoras de diabetes mellitus tipo 1.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e saúde para perseverar nessa caminhada.

Aos meus pais Cyro e Márcia, pelo amor incondicional, apoio e estímulos constantes.

Ao meu marido Freibergue, pelo carinho e paciência em todos os momentos.

Aos meus filhos Juliana e Leonardo, pela inspiração para a busca de ser o melhor de mim mesma.

Ao Prof. Dr. Ícaro Camargo Batista, pela amizade, estímulo e ajuda para encontrar o “caminho das pedras”.

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega, pela dedicação e paciência durante todo o “caminho”, e aos meus “co-orientadores” Prof. Dr. Riccardo Pratesi e Prof. Dr. Daniel França Vasconcelos pela atenção e ensinamentos fundamentais.

A todos os professores das disciplinas do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina e de Ciências da Saúde com quem ampliei meus conhecimentos e aos médicos colegas do HUB e HRAS, principalmente, Prof. Dr. João Pimentel, Profa. Dra. Lenora Gandolfi, Prof. Dra. Inês Cristina dos Santos Modelli, Profa. Dra. Maria do Carmo Scher, Prof. Dr. Luciano Máximo, Profa. Dra Alessandra dos Santos Domingues e Profa. Dra. Sueli Falcão, pelo apoio e companheirismo que tornaram minha vida mais fácil nesses dois anos de mestrado.

À Profa. Dra. Cátia Barbosa da Cruz e sua equipe de endocrinologia do HUB e à Dra. Maristela Estevão Barbosa do Hospital da Criança, que gentilmente cederam seus pacientes para o presente trabalho.

A todos os funcionários do laboratório de análises clínicas do HUB, principalmente, Sandra Maria Ferreira e Rosana Oliveira Borges Souza da pediatria, Fábio Barros Almeida e Mário Jorge Lopes da Silva, sem os quais este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos pais e responsáveis que permitiram a participação de suas crianças neste trabalho, apenas com a nobre intenção de contribuir para o aumento do conhecimento científico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura da parede vascular normal.

Figura 2 - Substâncias vasoativas derivadas do endotélio e suas ações.

Figura 3 - Representação esquemática das funções da célula endotelial.

Figura 4 - Disfunção endotelial como passo inicial para a aterosclerose.

Figura 5 – Síntese e efeitos biológicos do óxido nítrico.

Figura 6 - Via do polioliol-sorbitol.

Figura 7 - Hiperglicemia e disfunção endotelial.

Figura 8 - Função plaquetária e fatores de coagulação no diabetes.

Figura 9 - Inflamação da parede arterial em todos os estágios da aterosclerose.

Figura 10 – Foto demonstrando a posição do transdutor no membro superior.

Figura 11 - Imagem ultrassonográfica da artéria braquial em repouso.

Figura 12 - Imagem ultrassonográfica da artéria braquial após estímulo hiperêmico.

Figura 13 - Imagem ultrassonográfica do fluxo da artéria braquial em repouso.

Figura 14 - Imagem ultrassonográfica do fluxo da artéria braquial após estímulo hiperêmico.

Figura 15 - Avaliação do IMT da carótida por ultrassom.

Figura 16 - Ilustração esquemática da artéria carótida comum (ACC), sua bifurcação (BIF) e seus segmentos interno (ACI) e externo (ACE).

Figura 17 - Imagem ultrassonográfica em modo bidimensional da artéria carótida comum.

Figura 18 - Percentagem de dilatação fluxo-mediada (%FMD) nos quatro tempos estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos) após estímulo hiperêmico, nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 19 - Percentagem de dilatação fluxo-mediada (%FMD) avaliada em cada um dos quatro tempos após estímulo hiperêmico (1º, 3º, 5º e 9º minutos), segundo o gênero, nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos ≥ 5anos (DM1≥5).

Figura 20 - Índice de pulsatilidade (PI) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 21 - Índice de resistividade (RI) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 22 - Velocidade de pico sistólico (PS) do fluxo da artéria braquial no repouso (tempo 0 ou basal) e após estímulo hiperêmico nos quatro tempos estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 anos ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 23 - Percentual máximo de aumento da velocidade do pico sistólico (PS) do fluxo da artéria braquial após estímulo hiperêmico nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 24 - Velocidade no final da diástole (ED) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 25 - Razão velocidade de pico sistólico/velocidade no final da diástole (S/D) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 26 - Tempo de aceleração máxima (TA max) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 27 - Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 28 - Níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (PCR-US) nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 29 - Níveis séricos sE-selectina nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 30 - Níveis séricos sVCAM nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 31 - Níveis séricos sICAM nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 32 - Níveis séricos de metaloproteinase-9 (MMP-9) nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Figura 33 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e PCR-US.

Figura 34 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e sE-selectina.

Figura 35 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e VCAM-1.

Figura 36 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e HbA1c.

Figura 37 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e glicose de jejum.

Figura 38 – Correlação linear de Pearson entre % FMD e tempo de diagnóstico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para o diagnóstico laboratorial de *Diabetes mellitus*

Tabela 2 - Critérios de inclusão e exclusão para os grupos

Tabela 3 - Exames laboratoriais realizados

Tabela 4 - Distribuição dos grupos (controle e DM1) quanto ao gênero, idade e parâmetros laboratoriais

Tabela 5 - Distribuição do grupo controle e subgrupos de diabéticos quanto ao gênero, idade e parâmetros laboratoriais

Tabela 6 - Parâmetros ultrassonográficos de FMD (controle e grupo de estudo)

Tabela 7 - Parâmetros ultrassonográficos de FMD (controle, diabéticos e seus subgrupos)

Tabela 8 - Medidas da IMT da carótida por ultrassonografia (controle e DM1)

Tabela 9 - Medidas da IMT da carótida por ultrassonografia (controle e subgrupos DM1)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Diabetes Association*

AGL: ácidos graxos livres

ANG-II: angiotensina-II

CEP-FS: Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

ECG: eletrocardiograma

ED: velocidade do fluxo no final da diástole

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

DCCTRG: *Diabetic Control and Complications Trial Research Group*

DM1, DM2: *diabetes mellitus* tipo 1 e tipo 2, respectivamente

EDCF: fatores constritores derivados do endotélio

EDRF: fatores relaxantes derivados do endotélio

eNOS: sintetase de óxido nítrico endotelial

ET-1: endotelina-1

FMD: dilatação fluxo-mediada (*flow-mediated dilatation*)

HbA1c: hemoglobina glicada

HCB: Hospital da Criança de Brasília

HDL: lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*)

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho (*high performance liquid chromatography*)

HPS: Estreptavidina-Peroxidase (*Horseshoe Peroxidase Streptavidin*)

HUB: Hospital Universitária de Brasília

ICAM-1: moléculas de adesão celular intercelular-1

IDF: *International Diabetes Federation*

IL: interleucina

IMT: espessura íntima-média (*intima-media thickness*)

ISPAD: *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*

LDL: lipoproteína de baixa densidade (*low density protein*)

MMP: metaloproteinase matricial (*matrix metalloproteinase*)

Modo 2D: modo bidimensional

Modo M: modo unidimensional

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo hidrogenado

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NFκB: fator nuclear kappa B

nNOS: sintetase de óxido nítrico neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintetase

OMS: Organização Mundial da Saúde ou WHO: *World Health Organization*

PAI-1: inibidor da ativação do plasminogênio-1

PCR-US: proteína C reativa ultrasensível

PFGA: produtos finais da glicação avançada

PI: índice de pulsatilidade

PKC: proteína kinase C

PS: pico sistólico

RI: índice de resistividade

RNA: ácido ribonucleico

ROS: espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

S/D: razão pico de velocidade sistólica/pico de velocidade no final da diástole

sE-selectina: selectina endotelial solúvel

sICAM-1: moléculas de adesão celular intercelular-1 solúvel

sVCAM-1: moléculas de adesão celular vascular-1 solúvel

TA max: tempo de aceleração máximo

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

TMB: tetrametilbenzidina

TTOG: teste de tolerância oral à glicose

VCAM-1: moléculas de adesão celular vascular-1

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein*)

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) apresenta prevalência global crescente e cursa com complicações vasculares que constituem importantes fatores de risco para doenças de alta morbidade e mortalidade na vida adulta, como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e doença vascular periférica. As alterações estruturais típicas da aterosclerose são antecedidas por um processo de disfunção das células endoteliais que determina um estado sistêmico vasoconstrictor, pró-inflamatório e pró-trombótico que pode contribuir para o desenvolvimento das complicações vasculares diabéticas.

Objetivo: verificar a presença de disfunção endotelial e alterações estruturais iniciais de aterosclerose em crianças portadoras de DM1. **Métodos:** a população do estudo foi constituída por 31 crianças diabéticas (separadas em subgrupo com tempo de diagnóstico menor que 5 anos e outro com 5 anos ou mais) e 58 crianças saudáveis, com idades entre 6 e 12 anos. Técnicas ultrassonográficas foram utilizadas para medir a dilatação fluxo-mediada (FMD) da artéria braquial e a espessura das camadas íntima-média das artérias carótidas (IMT). Os achados ultrassonográficos foram correlacionados com os níveis séricos de marcadores inflamatórios (IL-6, PCR-US), marcadores de disfunção endotelial (sE-selectina, sVCAM-1 e sICAM-1) e de injúria vascular (MMP-9). **Resultados:** crianças diabéticas com tempo maior de diagnóstico apresentaram percentagem de dilatação fluxo-mediada máxima significativamente menor que o grupo controle. Os níveis séricos de sVCAM-1 mostraram-se significativamente elevados nos dois subgrupos de diabéticos, em relação ao controle, e os níveis séricos de PCR-US e sE-selectina foram significativamente maiores, em relação a este grupo, apenas no subgrupo de diabéticos com maior tempo de diagnóstico. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto à espessura médio-intimal e aos níveis séricos de IL-6, sICAM-1 e MMP-9. A resposta vasodilatadora apresentou correlação negativa com o tempo de diagnóstico de DM1 e os níveis de HbA1c e glicose de jejum. **Conclusão:** nossos achados sugerem que crianças diabéticas com 5 ou mais anos de diagnóstico já podem apresentar disfunção endotelial e um estado inflamatório sistêmico de baixa intensidade, embora sem alterações estruturais de aterosclerose.

Palavras-chave: *diabetes mellitus* tipo 1, disfunção endotelial, aterosclerose, dilatação fluxo-mediada, espessura médio-intimal, IL-6, PCR-US, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, MMP-9

ABSTRACT

Type 1 *Diabetes mellitus* (DM1) displays an increasing global prevalence and its resultant cardiac, cerebral and peripheral vascular complications represent important risk factor for high morbidity and mortality in adult life. The development of DM1 vascular complications is preceded by endothelial dysfunction that result in systemic vasoconstriction and contribute to the progress to a pro-inflammatory and pro-thrombotic state. **Objective:** The purpose of this study was to verify the presence of endothelial dysfunction and initial structural changes of atherosclerosis in diabetic children. **Methods:** Thirty-one diabetic children aged 6-12 years, divided in two subgroups according to disease length composed the study group: subgroup 1, with less than five years and subgroup 2, with more than five years of disease span. Fifty-eight age-matched healthy children composed the control group. Ultrasonographic techniques were used to measure the flow-mediated dilatation of the brachial artery (FMD), and the intima-media thickness of carotid arteries (IMT). The ultrasonographic findings were correlated to plasmatic levels of inflammatory biomarkers (IL-6, hs-CRP), endothelial dysfunction (sE-selectin, sVCAM-1, sICAM-1) and vascular injury biomarkers (MMP-9). **Results:** Diabetic children with increased disease length disclosed flow-mediated dilatation maximum percentage mean values significantly decreased when compared with the values found in the control group. Levels of sVCAM-1 were significantly higher in both diabetic subgroups while the levels of hs-CRP and sE-selectin were significantly higher only in the subgroup with more than five years of disease length when compared to controls. Study groups and controls did not disclosed significant differences in relation to IMT, IL-6, sICAM-1 and MMP-9 levels. Vasodilator response was negatively correlated to disease length, plasmatic levels of HbA1c and fasting glucose. **Conclusion:** Our findings suggest that endothelial dysfunction and a low level of systemic inflammatory state may be already present in diabetic children with five more than years of disease length, in spite of absence of atherosclerotic structural changes.

Key-words: type 1 *diabetes mellitus*, endothelial dysfunction, atherosclerosis, flow-mediated dilatation, carotid intima-media thickness, IL-6, hs-CRP, E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, MMP-9

SUMÁRIO

Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas e Siglas	XIV
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1.INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 - <i>Diabetes mellitus</i> tipo1: conceito, etiologia e diagnóstico clínico e laboratorial ...	03
2.2 - <i>Diabetes mellitus</i> tipo1: dados epidemiológicos e suas complicações vasculares ..	04
2.3 - Endotélio vascular: função endotelial e óxido nítrico	06
2.4 - <i>Diabetes mellitus</i> e disfunção endotelial	10
2.4.1. Vias metabólicas ativadas: hiperglicemia e indução da disfunção endotelial	11
2.4.1.1. Ativação da proteína kinase C	11
2.4.1.2. Formação de Produtos Finais da Glicação Avançada	12
2.4.1.3. Via da hexosamina	13
2.4.1.4. Aumento do fluxo de glicose através da via poliol-sorbitol	13
2.4.1.5. Via da glicólise	14
2.4.1.6. Ativação da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial	14
2.4.2. Ácidos graxos livres e disfunção endotelial	16
2.4.3. Mediadores endoteliais vasoconstritores e disfunção endotelial	17
2.5. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 e o comprometimento da musculatura lisa vascular	18
2.6. <i>Diabetes mellitus</i> e estado pró-trombótico	18
2.7. <i>Diabetes Mellitus</i> e aterosclerose	19
2.8. Exames ultrassonográficos diagnósticos das alterações vasculares	21
2.8.1. Dilatação fluxo-mediada	21

2.8.2. Medida da espessura íntima-média da carótida	22
2.9. Biomarcadores de disfunção endotelial e aterosclerose	23
3. OBJETIVO	26
4. MÉTODO	27
4.1. População	27
4.2. Estudos Ultrassonográficos	29
4.2.1. Técnica de FMD da artéria braquial	29
4.2.2. Técnica de IMT da carótida	33
4.3. Exames laboratoriais	35
4.3.1. Hemograma	38
4.3.2. Hemoglobina glicada (HbA1c)	38
4.3.3. Colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL e VLDL	38
4.3.4. Glicose	38
4.3.5. PCR Ultrassensível (PCR-US)	39
4.3.6. Interleucina-6 (IL-6)	39
4.3.7. Selectina Endotelial (E-selectina)	39
4.3.8. Moléculas de Adesão Celular Intracelulares 1 (ICAM-1)	40
4.3.9. Moléculas de Adesão Celular Vasculares 1 (VCAM-1)	40
4.3.10. Metaloproteinase-9 matricial (MMP-9)	40
4.4. Análise Estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Características dos grupos e análises laboratoriais	41
5.2. Estudos ultrassonográficos	43
5.2.1. Resultados obtidos pela técnica de FMD	43
5.2.2. Resultados obtidos pela técnica de medida da IMT	52

5.3. Análises laboratoriais específicas	53
5.4. Correlação entre variáveis	56
6. DISCUSSÃO	60
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
8. REFERÊNCIAS	70
9. APÊNDICE	83

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença crônica com prevalência global crescente e complicações que envolvem alterações micro e macrovasculares (GIANNINI et al., 2011).

As alterações em grandes vasos, particularmente a aterosclerose, são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos, pois o DM1 aumenta substancialmente o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, cerebrovascular e doença arterial periférica (CREAGER et al., 2003). Devido ao contínuo aumento na incidência do DM1, as doenças vasculares relacionadas representam uma emergente e significativa questão de saúde pública com preocupante impacto econômico mundial (GIANNINI et al., 2011).

As alterações metabólicas que caracterizam o DM1, como a hiperglicemia e o aumento de Ácidos Graxos Livres (AGL) circulantes, desencadeiam mecanismos moleculares que contribuem para o desenvolvimento de disfunção endotelial. Estes mecanismos incluem a diminuição na biodisponibilidade do óxido nítrico (nitric oxide - NO), o aumento do estresse oxidativo, distúrbios na sinalização da transdução intracelular, e a ativação de Produtos Finais da Glicação Avançada (PFGA) (CREAGER et al., 2003).

A disfunção endotelial precede as alterações estruturais do processo aterosclerótico e caracteriza-se pelo comprometimento do tônus vascular que resulta em uma resposta vasodilatadora diminuída (CALLES-ESCANDON e CIPOLLA, 2001). Além desse estado de vasoconstrição, o comprometimento endotelial leva à liberação de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e várias outras substâncias biologicamente ativas que determinam a instalação de um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (BECKMAN et al., 2002). Esses mecanismos representam um importante passo inicial para alterações ateroscleróticas e suas potenciais complicações nos pacientes com DM1 (SHEETZ e KING, 2002).

Embora as complicações macrovasculares do DM1 usualmente não apresentem manifestações clínicas na infância e na adolescência, exames ultrassonográficos, confiáveis e não invasivos, permitem o diagnóstico precoce da disfunção endotelial, por meio do estudo da Dilatação Fluxo-Mediada (*Flow-Mediated Dilatation* - FMD), bem como de alterações estruturais iniciais da aterosclerose, por meio da medida da Espessura das camadas Íntima-Média da carótida (*Intima-Media Thickness* - IMT) (JÄRVISALO et

al., 2004). A FMD é definida como uma vasodilatação reativa da artéria braquial após estímulo de hiperemia (CELERMAJER et al., 1992) e apresenta valor preditivo de futura doença cardiovascular, quando diminuída (SHIVALKAR et al., 2006). Do mesmo modo, o aumento da espessura da camada médio-intimal da carótida medida pela técnica de IMT está relacionada com fatores de risco para doença cardiovascular, doença cardiovascular prevalente e aterosclerose nas artérias periféricas, coronárias e femorais, sendo considerado um forte preditor de doenças vasculares em indivíduos com risco elevado, como os portadores de DM1 (O'LEARY et al., 1999).

Um melhor entendimento dos mecanismos que levam à disfunção endotelial e seu diagnóstico em fases iniciais pode favorecer a implementação de estratégias que previnam ou reduzam a morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com DM1.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Diabetes mellitus* tipo 1: conceito, etiologia e diagnóstico clínico e laboratorial

O termo *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) representa um distúrbio metabólico complexo, caracterizado por hiperglicemia crônica decorrente de um defeito absoluto na secreção pancreática de insulina, resultando em anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (WHO, 2006; ADA, 2014a). A etiologia é multifatorial e os papéis específicos da suscetibilidade genética, de fatores ambientais (infecciosos e químicos), do sistema imunológico e das células beta pancreáticas na patogênese do DM1, permanecem pouco conhecidos. No entanto, na maioria dos casos, a destruição das células beta do pâncreas é mediada por um processo autoimune de grau variável, com o surgimento de sintomatologia apenas quando cerca de 90% das células são destruídas (ISPAD, 2014).

Os critérios diagnósticos baseiam-se em medidas da glicose plasmática em presença ou ausência de sintomas (WHO, 2006; ADA, 2014b). Pacientes jovens apresentam usualmente sintomas característicos como: poliúria, polidipsia, noctúria, enurese, perda de peso (acompanhada ou não de polifagia), visão turva, além da possibilidade de comprometimento do crescimento e suscetibilidade a certas infecções (ISPAD, 2014). Os métodos laboratoriais que podem ser utilizados para o diagnóstico estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Critérios para o diagnóstico laboratorial de *Diabetes mellitus*

-
- 1- - Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, uma concentração de glicose plasmática $\geq 11,1$ mmol/L (200mg/dL) ou
 - 2- - Glicose plasmática de jejum* $\geq 7,0$ mmol/L (≥ 126 mg/dL) ou
- Glicose plasmática após 2h de carga de glicose em TTOG# $\geq 11,1$ mmol/L (≥ 200 mg/dL)
 - 3- - HbA1c** $> 6,5\%$ †
-

Os testes devem ser repetidos em pelo menos 2 ocasiões

*Jejum definido como pelo menos 8h sem ingestão calórica

#TTOG, teste de tolerância oral a glicose

**HbA1c, hemoglobina glicada

†Valores $\leq 6,5\%$ não excluem o diagnóstico de diabetes por testes de glucose. O papel da HbA1c isolada no diagnóstico do diabetes tipo 1 em crianças não está claro.

Fonte: adaptada de ADA, 2014a

2.2. *Diabetes mellitus* tipo 1: dados epidemiológicos e suas complicações vasculares

O *Diabetes mellitus* é uma doença crônica prevalente em todas as regiões do mundo, sendo considerada uma importante causa de morte principalmente em países desenvolvidos e, em menor escala, em várias nações em desenvolvimento (CRAIG e DONAGHUE, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) projeta que, devido às suas complicações, o diabetes representará em 2030 a sétima principal causa de morte no planeta, além de um significativo aumento em sua prevalência e número de óbitos nos países de baixa renda *per capita* (WHO, 2011, apud MATHERS E LONCAR, 2006).

Em 2008, pelo menos 346 milhões de pessoas em todo o mundo apresentavam algum tipo de diabetes, estimando-se que 5-10% correspondiam ao tipo 1 e 90-95% ao tipo 2 da doença (DANAIEI et al., 2011). Em 2012, o número total de diabéticos no Brasil era estimado em 12 milhões ou 6,2% da população, com distribuição semelhante aos padrões mundiais entre os tipos 1 e 2 e, segundo declaração do Ministério da Saúde, em 2013, 500 novos casos de diabetes foram diagnosticados todos os dias no Brasil (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014).

O DM1 continua a representar a forma mais comum de diabetes em pessoas jovens em muitas populações, especialmente as de origem caucasiana (ISPAD, 2014). Na maioria dos países ocidentais, o DM tipo 1 é responsável por 90% dos casos em crianças e adolescentes, embora menos da metade dos indivíduos com DM1 seja diagnosticado antes de 15 anos de idade (GLOBAL IDF/ISPAD, 2011). A incidência mundial de DM1 aumenta cerca de 3% ao ano, com estimativa de 65000 novos casos diagnosticados anualmente (GLOBAL IDF/ISPAD, 2011) e, em alguns estudos evidencia-se um aumento desproporcional na população abaixo de 5 anos (SOLTESZ et al., 2007; KING et al. 1998).

A epidemia global de *Diabetes mellitus* com suas complicações micro e macrovasculares representa um enorme custo social e econômico em todo o mundo (GIANNINI et al., 2009). Embora não apresente manifestações clínicas evidentes antes da adolescência e juventude, a microangiopatia constitui a principal alteração vascular na criança, adolescente e no adulto jovem (DONAGHUE et al., 2009) e, por desencadear doenças como retinopatia, nefropatia e neuropatia, constitui importante causa de cegueira, insuficiência renal em estágio final e neuropatia periférica (CREAGER et al., 2003). O tempo de evolução da doença e o mau controle dos níveis glicêmicos são considerados os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento (DCCTRG, 1993). Entretanto, a

maior causa de morbidade e mortalidade precoce na vida adulta está associada a macroangiopatia que, como as alterações de pequenos vasos, relaciona-se a um controle glicêmico ruim e ao tempo de evolução da doença. Para que tal fato ocorra, o processo aterosclerótico inicia-se de forma gradual e assintomática, ainda na infância, sendo responsável pelo desenvolvimento de doença cardiovascular, cerebrovascular e doença vascular periférica na vida adulta (DONAGHUE et al., 2009). De forma característica, o processo de depósito de lipoproteínas oxidadas, cálcio e restos celulares na camada íntima da parede dos vasos é antecedido por disfunção das células endoteliais e inflamação vascular. O acúmulo de lipídios resulta, então, no espessamento da camada íntima, formação da placa aterosclerótica e remodelamento vascular. Evolutivamente, as obstruções agudas e crônicas do lúmen do vaso levam a anormalidades do fluxo sanguíneo, e diminuição do aporte de oxigênio aos órgãos alvos (WILLIAMS e TABAS 1995).

Diabéticos apresentam um risco 2-4 vezes maior de desenvolverem doenças ateroscleróticas, não relacionadas aos fatores de risco usuais (PYÖRÄLÄ et al., 1987), além de apresentarem um risco 3-6 vezes maior de morte por problemas cardiovasculares antes de 60 anos de idade, em comparação com indivíduos não diabéticos (KROLEWSKI et al., 1987).

Embora a maioria dos estudos em diabetes e doença macrovascular aborde o *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), o risco relativo de doença cardiovascular, ajustado para a idade, no DM1 excede bastante o do DM2. Apesar da taxa de doença cardiovascular em pacientes com DM1 ser significativamente menor que em indivíduos com DM2, o risco relativo de morte por doença coronariana é sete vezes maior em pacientes com DM1 em relação a indivíduos não diabéticos da mesma faixa etária, e apenas duas vezes maior, nos indivíduos com DM tipo 2 (LAING et al., 2003).

Avanços no tratamento do diabetes levaram a uma diminuição na morbidade e na mortalidade por complicações microvasculares relacionadas ao diabetes (retinopatia, nefropatia e neuropatia), no entanto, não se observou o mesmo no que diz respeito às taxas de mortalidade de pacientes com doenças cardiovasculares relacionadas ao diabetes (PAMBIANCO et al., 2006).

Como as alterações vasculares do diabetes tipo 1 têm início na infância, a caracterização de fatores de risco potencialmente modificáveis, ainda nessa fase do desenvolvimento, pode permitir a intervenção em estágios iniciais da doença vascular (GIANNINI et al., 2011) e, dessa forma, reduzir seu crescente impacto social e econômico a nível global.

2.3. Endotélio vascular: função endotelial e óxido nítrico

A parede dos vasos sanguíneos é constituída por três camadas (figura 1): a túnica íntima formada por uma camada de células endoteliais apoiadas em uma membrana basal de tecido conjuntivo frouxo; a túnica média formada por um grupo de células musculares lisas dispostas concentricamente, revestida interna e externamente por lâminas de elastina; e a túnica externa ou adventícia formada por fibras colágenas entrelaçadas frouxamente (MARIEB e HOEHN, 2008).

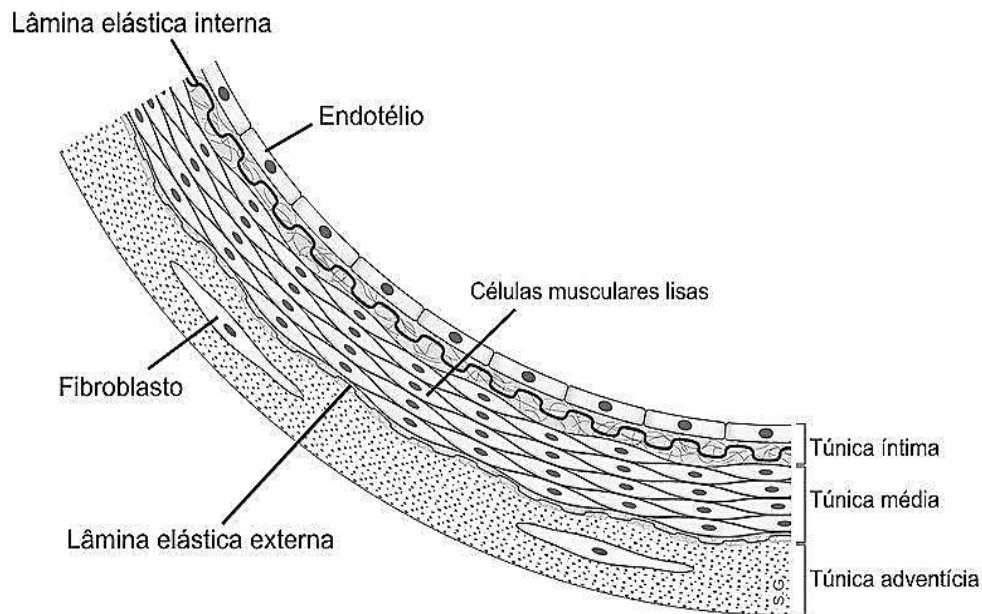


Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura da parede vascular normal

Fonte: <http://nutrisdoexercicio.wordpress.com/2013/05/23/aterosclerose-e-funcao-endotelial/>

O endotélio vascular reveste a superfície interna do vaso sanguíneo formando uma barreira entre o sangue e os tecidos, e as células endoteliais que o constituem não apresentam apenas função estrutural, mas são capazes de responder a um estresse fisiológico e desempenhar importante papel na manutenção da integridade da parede, por meio da regulação do tônus, da permeabilidade, do remodelamento, da inflamação e da trombo-resistência vasculares (HIRASE e NODE, 2012). As células endoteliais sintetizam e liberam um grande número de substâncias biologicamente ativas que estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo regional e complexas funções da musculatura lisa e de outras células dos vasos sanguíneos, assim como do compartimento sanguíneo (figura 2) (VANE et al., 1990).

Duas classes de substâncias com efeito sobre o tônus vascular são sintetizadas: fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) e fatores constritores derivados do

endotélio (EDCF). Os primeiros, como é o caso do óxido nítrico (NO), protegem a parede vascular da lesão aterogênica, ao contrário dos fatores constritores, como a endotelina, que participam da progressão de doenças vasculares ao promover a adesão de monócitos e plaquetas, o aumento da permeabilidade vascular, a proliferação e a migração de células musculares lisas, resultando na formação de placa ateromatosa e no espessamento da túnica íntima (figura 2) (HARRISON, 1997).

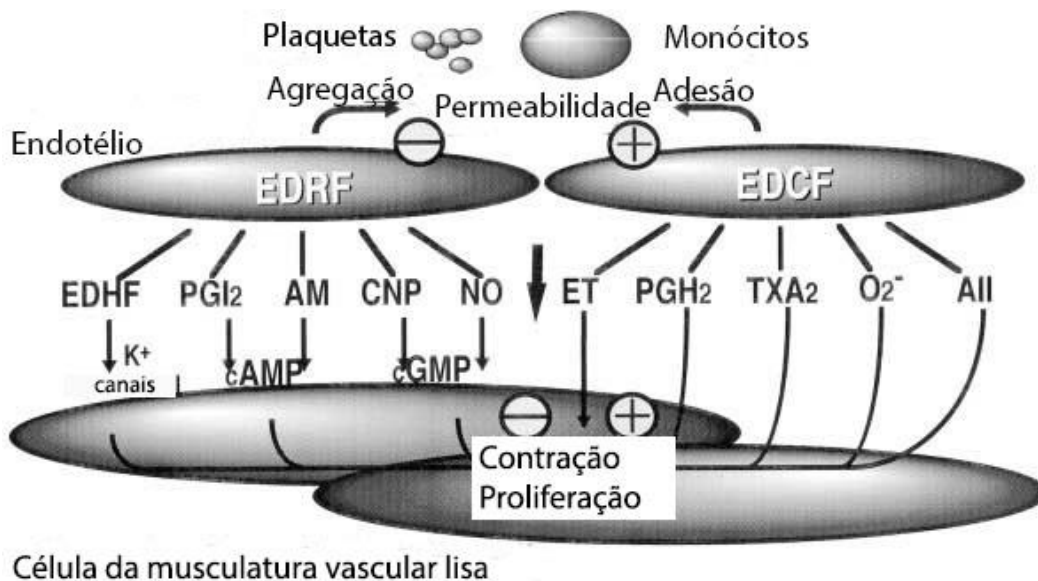


Figura 2 - Substâncias vasoativas derivadas do endotélio e suas ações
 EDRF: fatores relaxantes derivados do endotélio, EDCF: fatores constritores derivados do endotélio, EDHF: fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, PGI₂: prostaciclina I₂, AM: adrenomedulina, CNP: peptídeo natriurético tipo C, NO: óxido nítrico, ET: endotelina, PGH₂: prostaglandina H₂, TXA₂: tromboxano A₂, O₂⁻: superóxido, AII: angiotensina II.
 Fonte: Adaptada de Matsuoka, 2001.

As células endoteliais desempenham papel chave no remodelamento vascular por meio da liberação de fatores de crescimento e diferenciação das células da musculatura lisa vascular, e seus inibidores (COWAN e LANGILLE, 1996). Além disso, estão envolvidas na produção de moléculas específicas que apresentam papel regulatório na inflamação, atuando como âncora para células envolvidas na reação inflamatória. Essas moléculas são denominadas moléculas de adesão, sendo as principais: a molécula de adesão intercelular (ICAM), a molécula de adesão da célula vascular (VCAM) e a selectina endotelial (E-selectina) (BIEGELSEN e LOSCALZO, 1999). As células endoteliais participam ainda da regulação da hemostasia, apresentando papel na manutenção da fluidez sanguínea e restauração da integridade da parede do vaso após

lesão. O equilíbrio entre os sistemas de coagulação e fibrinolítico é mantido principalmente por meio da síntese local do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (figura 3) (DAWSON e HENNEY, 1992).

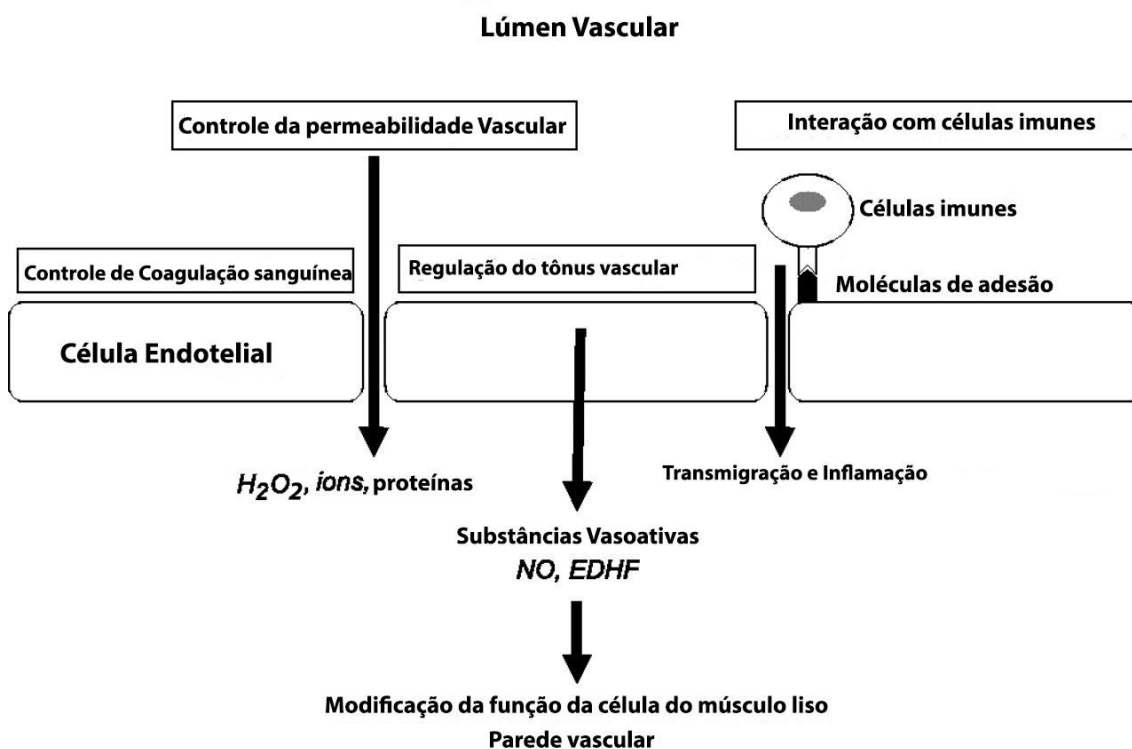


Figura 3 - Representação esquemática das funções da célula endotelial.

NO: óxido nítrico, EDHF: fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio.

Fonte: Adaptada de Hirase e Node, 2012

A disfunção endotelial pode envolver aumento ou diminuição de qualquer mensageiro químico relacionado ao endotélio e/ou alteração em qualquer uma das funções endoteliais mencionadas acima. No entanto, as alterações das células endoteliais promotoras de disfunção mais comumente aceitas relacionam-se a anormalidades na regulação do tônus vascular (CALLES-ESCANDON e CIPOLLA, 2001).

Na disfunção endotelial ocorre um desequilíbrio da produção dos fatores derivados do endotélio, com o predomínio da ação dos fatores constritores, o que representa o passo inicial para o desenvolvimento de aterosclerose (figura 4) (DREXLER, 1997).

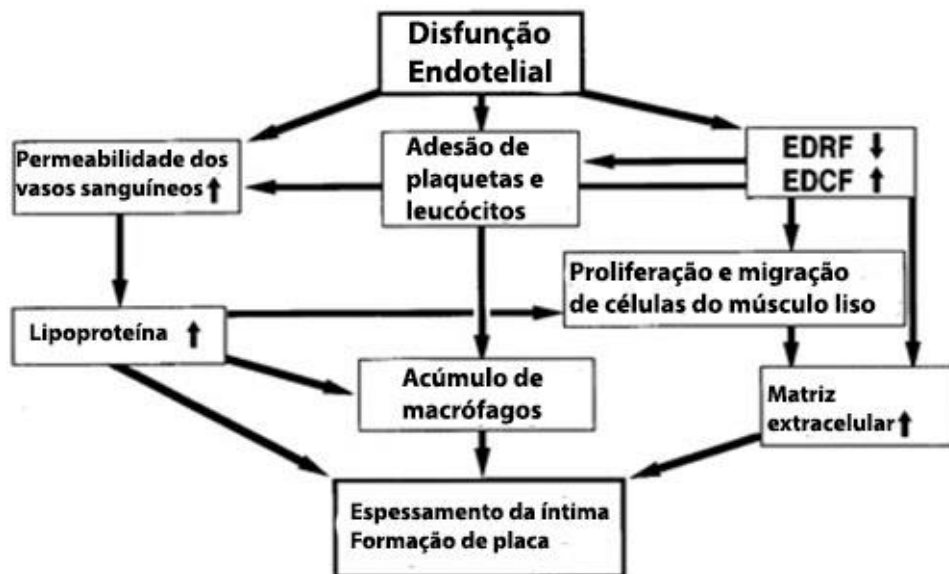


Figura 4 - Disfunção endotelial como passo inicial para a aterosclerose
EDRF: fatores relaxantes derivados do endotélio, EDCF: fatores constritores derivados do endotélio.

Fonte: Adaptada de Matsuoka, 2001

Entre as substâncias citadas, o NO é sintetizado não só pelas células endoteliais, mas também por uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais, nervosas e inflamatórias. É produzido por ação da enzima NO sintetase (NOS) que forma NO e L-citrulina, a partir do aminoácido L-arginina, utilizando como cofatores o oxigênio molecular e o NADPH (COLEMAN, 2001). Existem quatro tipos de NOS: dois denominados “constitutivos”, originalmente caracterizados como de origem neuronal (nNOS ou NOS-1) e endotelial (eNOS ou NOS-3); e outros dois, denominados “induzidos” (NOS-2 e NOS-4), sintetizados por macrófagos, em condições não fisiológicas, em resposta a citocinas inflamatórias e componentes bacterianos (NATHAN e XIE, 1994; CALLES-ESCANDON e CIPOLLA, 2001). Os dois primeiros tipos de NOS dependem do íon cálcio para sua ativação, que ocorre de forma rápida e transitória, assim como sua produção de NO. Por outro lado, a ativação das enzimas do tipo induzido não depende do íon cálcio e apresenta ação contínua e prolongada, com a produção de NO com papel principalmente imunológico: na toxicidade celular sobre patógenos, indução ou supressão de apoptose e imunorregulação (MONCADA et al., 1991).

Uma vez sintetizado, o NO difunde-se prontamente nos tecidos e é capaz de atravessar membranas celulares livremente, apresentando uma meia-vida de segundos a minutos, de acordo com o meio químico circunjacente. Em condições aeróbicas é rapidamente oxidado em Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species* -

ROS), sendo o N_2O_3 (trióxido de dinitrogênio) seu principal produto oxidativo. Como as ROS são moléculas instáveis, são nitrosadas a tióis ou aminas, ou hidrolisadas e excretadas sob a forma de nitritos (NO_2^-) (WINK et al., 1996).

O NO sintetizado pelas células endoteliais é um fator com efeito relaxante, cuja biodisponibilidade constitui a chave para o bom funcionamento vascular (CREAGER et al., 2003). Além de induzir a vasodilatação por meio da ativação da guanilil ciclase das células da musculatura lisa adjacente, o NO protege o vaso sanguíneo de lesões endógenas próprias da aterosclerose ao mediar sinais moleculares que impedem a interação entre plaquetas e leucócitos com a parede vascular, e inibem a proliferação e migração de células da musculatura lisa vascular (RADOMSKI et al., 1987; KUBES et al., 1991). A biodisponibilidade do NO derivado do endotélio reflete o equilíbrio entre a produção pela eNOS e sua degradação, particularmente pelas ROS (figura 5) (COSENTINO et al., 1997; CREAGER et al., 2003).



Figura 5 – Síntese e efeitos biológicos do óxido nítrico

eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial, O₂: molécula de oxigênio

Fonte: Adaptada de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000300002

2.4. Diabetes mellitus e disfunção endotelial

As alterações metabólicas que ocorrem no DM1, como a hiperglicemia e o excesso de liberação de ácidos graxos livres podem levar a anormalidades na função das células endoteliais (KING, 1996). O comprometimento das propriedades fisiológicas do endotélio determina um estado vasoconstrictor, pró-inflamatório e pró-trombótico

sistêmicos que pode contribuir para o desenvolvimento das complicações vasculares diabéticas (BECKMAN et al., 2002).

Como mencionamos acima, a disfunção endotelial pode ser considerada o evento inicial do processo aterosclerótico, resultando principalmente do desequilíbrio na produção e biodisponibilidade de fatores reguladores da função vasomotora produzidos pelas células endoteliais como, a endotelina-1 (ET-1), a angiotensina-II (ANG-II) e particularmente o óxido nítrico (GIMBRONE, 1999; STEHOUWER et al., 1997).

Estudos da década de 90 em modelos experimentais de diabetes (TESFAMARIAM et al., 1990; PIEPER et al., 1995), bem como em pacientes com diabetes tipo 1 e 2 evidenciam um comprometimento da vasodilatação endotélio-dependente, mediada pelo NO (PIEPER et al., 1995; JOHNSTONE et al., 1993).

2.4.1. Vias metabólicas ativadas: hiperglicemia e indução da disfunção endotelial

A concentração de glicose intracelular nas células endoteliais reflete a concentração do meio extracelular, devido à inexistência de mecanismos celulares de regulação negativa à entrada de glicose (KAISER et al., 1993). A hiperglicemia afeta a função endotelial rompendo mecanismos moleculares que regulam a síntese de NO e/ou sua degradação (BECKMAN et al., 2002). Isso é observado não apenas na hiperglicemia crônica, mas também após episódios agudos e transitórios de hiperglicemia provocados em modelos animais e humanos (WILLIAMS et al., 1998; TAYLOR e POSTON, 1994). Em realidade, a variabilidade glicêmica no DM1 parece apresentar efeito deletério maior sobre a função endotelial e aumento do estresse oxidativo que níveis constantemente elevados de glicose plasmática (SIEGELAAR et al., 2010).

Quatro vias metabólicas principais e 2 adicionais são ativadas patologicamente como consequência da hiperglicemia intracelular (GIANNINI et al., 2011). As vias metabólicas principais são: a ativação da proteína kinase C (PKC), a formação de produtos finais da glicação avançada (PFGA), a via da hexosamina, e a via do poliolsorbitol.

2.4.1.1. Ativação da proteína kinase C (PKC)

O acúmulo de triosefosfato derivado da glicose ativa a PKC, que compromete o sistema vascular ao: estimular a produção de matriz extracelular, ativar a resposta inflamatória por meio da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, determinar a perda da reatividade vascular por inibição da fosforilação da eNOS,

determinar o aumento da permeabilidade endotelial e o espessamento da membrana basal. Estudos mostram que suas isoformas PKC- β e PKC- δ aumentam a expressão de genes como os do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), da endotelina-1 (ET-1), do fator de crescimento do endotélio vascular e do fator transformador do crescimento- β (KOYA e KING, 1998).

2.4.1.2. Formação de Produtos Finais da Glicação Avançada (PFGA)

Outro efeito induzido pelas concentrações elevadas de glicose circulante e intracelular do diabetes é a reação não enzimática entre glicose e proteínas na parede arterial, levando a um aumento na formação de produtos finais da glicação avançada (GIANNINI et al., 2011). A formação contínua de PFGAs rompe processos moleculares e altera a atividade enzimática de várias proteínas intracelulares, incluindo fatores de transcrição de ácidos nucleicos e macromoléculas (GIANNINI et al., 2011). Os mecanismos de ação sugeridos para os PFGAs incluem não só o incremento na produção de radicais livres (WAUTIER et al., 2001), mas o comprometimento da produção do NO pela redução da meia-vida do RNA mensageiro da eNOS e a redução da atividade da enzima (ROJAS et al., 2000).

Os efeitos deletérios na aceleração do processo de aterosclerose pelos PFGAs podem ocorrer também por mecanismos mediados por receptores transmembrana de produtos finais da glicação avançada (RPFGA) (SCHMIDT et al., 1994). A ligação dos RPFGA leva à ativação de fatores de transcrição nuclear, incluindo o fator nuclear kappa B (NF κ B) e, por essa ativação, à indução da transcrição de diferentes genes alvos como os de: ET-1, molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1), E-selectina, fator tecidual, fator de crescimento endotelial vascular, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do gene do receptor RPFGA (SCHMIDT et al., 1999). Dessa forma, a participação dos RPFGAs, induzidos pelos PFGAs, leva à expressão de várias moléculas de adesão nas células endoteliais, determinando a adesão de leucócitos à parede vascular (CHAVAKIS et al., 2003). Esse processo promove respostas pró-inflamatórias que levam ao agravamento das complicações vasculares do diabetes (GIANNINI et al., 2011).

PFGAs podem provocar ainda uma redução da expressão da trombosmodulina e um aumento da expressão do fator tecidual no endotélio, alterando a estrutura da superfície vascular de um estado anticoagulante para um estado pró-coagulante

(BIERHAUS et al., 1997; ESPOSITO et al., 2003), além de contribuir para a redução na biodisponibilidade e atividade do NO derivado do endotélio (BUCALA et al., 1991)

2.4.1.3. Via da hexosamina

A via da hexosamina representa outro mecanismo pelo qual o aumento na concentração de glicose intracelular contribui para a lesão vascular endotelial (GIANNINI et al., 2011). Nessa via, em particular, a frutose-6-fosfato é convertida em uridina difosfato-N-acetil glicosamina por ação da enzima L-glutamina:D-frutose-6-fosfato amidotransferase. A entrada de excesso de glicose na via resulta no comprometimento da atividade de transcrição e da função enzimática normal, uma vez que a uridina difosfato glicosamina é uma precursora do proteoglicano e indutora da glicosilação de várias proteínas nucleares (HART et al., 2007). Dessa forma, o aumento na glicosilação de fatores de transcrição leva ao subsequente aumento da transcrição do gene do PAI-1 e do fator- β transformador de crescimento, determinando uma desregulação da hemostasia e alterações na estrutura da parede vascular (DU et al., 2000).

2.4.1.4. Aumento do fluxo de glicose através da via poli-ol-sorbitol

A via do poli-ol-sorbitol também está implicada nas complicações vasculares do diabetes em modelos animais (GIANNINI et al., 2011). Nessa via, a aldose redutase e a sorbitol desidrogenase catalisam a conversão da glicose em sorbitol e frutose, respectivamente, por meio da oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em NADP^+ e redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em nicotinamida adenina hidrogenada (NADH). O excesso de influxo de glicose na via do sorbitol leva a uma amplificação do estresse osmótico pelo aumento no acúmulo de sorbitol, determinando o influxo de líquido para o meio intracelular, com alteração da permeabilidade vascular e início de lesão celular. O sorbitol acumulado pode reagir com o nitrogênio de proteínas como o colágeno e gerar PFGAs. Além disso, a depleção do NADPH e NAD^+ leva a um aumento do estresse oxidativo por acúmulo de radicais livres, pois participam da redução de superóxidos em todo o organismo, e da síntese do antioxidante glutadiona, implicado na eliminação de peróxidos. Esses cofatores participam, ainda, da síntese do óxido nítrico, cuja depleção contribui para o comprometimento da resposta vasodilatadora dependente do endotélio (GIANNINI et al., 2011).

Há relatos de que os níveis de sorbitol e de frutose são aproximadamente nove vezes maiores, e os níveis de NADH/NAD⁺ aproximadamente quatro vezes mais elevados em coração de diabéticos (GIANNINI et al., 2011).

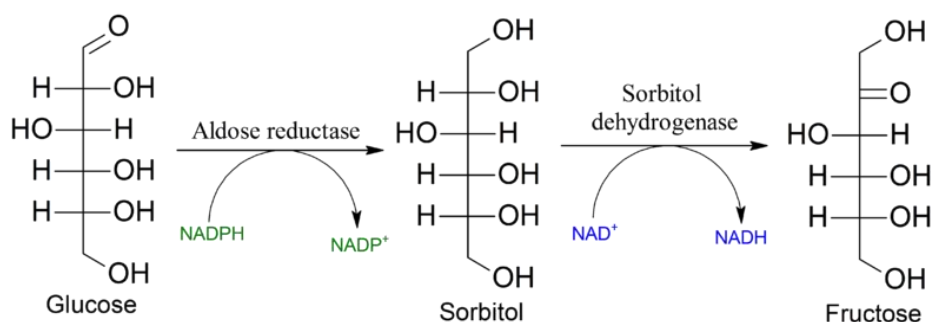


Figura 6 - Via do poliálcool-sorbitol
 Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Polyol_pathway

Além das vias metabólicas principais descritas acima, existem duas vias adicionais envolvidas, em decorrência da hiperglicemia intracelular (GIANNINI et al., 2011).

2.4.1.5. Via da glicólise

A via da glicólise está relacionada com cada uma das vias metabólicas principais descritas anteriormente. É ativada pelo estado hiperglicêmico e intermedeia a produção de ROS, incrementando o estado de estresse oxidativo (BROWNLEE, 2001; DU et al., 2003). Estas moléculas não só exercem uma ação tóxica direta sobre as células, mas interferem na função de fatores vasoativos endoteliais. Além disso, os produtos intermediários da glicólise, formados continuamente, interagem com as quatro vias bioquímicas principais, resultando em grande variedade de danos celulares (BROWNLEE, 2001; DU et al., 2003).

2.4.1.6. Ativação da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial

A hiperglicemia induz um estresse oxidativo adicional pelo aumento na produção de ânions superóxidos pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e ativação de oxidases dependentes do NADPH (INOICHI et al., 2000). O excesso de produção de superóxidos pelas mitocôndrias leva a um aumento na formação de peroxinitritos (pela interação do NO com ânions superóxidos), os quais desacoplam a eNOS, determinando a transferência de elétrons dessa molécula para moléculas de oxigênio e subsequente

formação de superóxidos adicionais, em lugar da L-arginina, que levaria à formação de NO (VASQUEZ-VIVAR et al.; 1998, XIA et al., 1998).

O estresse oxidativo prejudica a atividade enzimática da dimetilarginina dimetilaminohidrolase, resultando no aumento dos níveis da dimetilarginina assimétrica que, por similaridades com a L-arginina, age como um antagonista competitivo, ligando-se à eNOS e inibindo a formação de NO (LIN et al., 2002). Além disso, a produção de radicais livres sob estresse oxidativo, mediado pela hiperglicemia, pode inibir diretamente a produção de NO estimulada pela insulina, por meio do aumento na fosforilação da serina do receptor substrato-1 da insulina (POTASHNIK et al., 2003).

O conceito de que o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia medeia a disfunção endotelial em diabéticos é apoiado por observações de que a infusão intra-arterial de agentes antioxidantes, como o ácido ascórbico, restaura a vasodilatação dependente do endotélio em indivíduos saudáveis e diabéticos expostos à hiperglicemia (BECKMAN et al., 2001; TIMIMI et al., 1998).

Em síntese, a hiperglicemia induz profundas alterações pró-ateroscleróticas no endotélio vascular. Os mecanismos incluem: diminuição na atividade da eNOS e aumento na ativação da ET-1 e ANG-II que levam a vasoconstricção; ativação do NF- κ B e expressão de vários genes inflamatórios que promovem um aumento na expressão de substâncias quimiotáticas de leucócitos, citocinas inflamatórias, e moléculas de adesão celular; e o aumento na produção de fatores teciduais e PAI-1 que determinam um estado pró-trombótico. Estas alterações representam o importante passo inicial para o estabelecimento das fases subsequentes da aterosclerose, em particular, a adesão e penetração de monócitos circulantes na camada íntima e a entrada de lipoproteínas modificadas dependentes de monócitos, resultando no acúmulo de células espumosas e geração de estrias gordurosas, a lesão típica de aterosclerose inicial (GIANNINI et al., 2011).

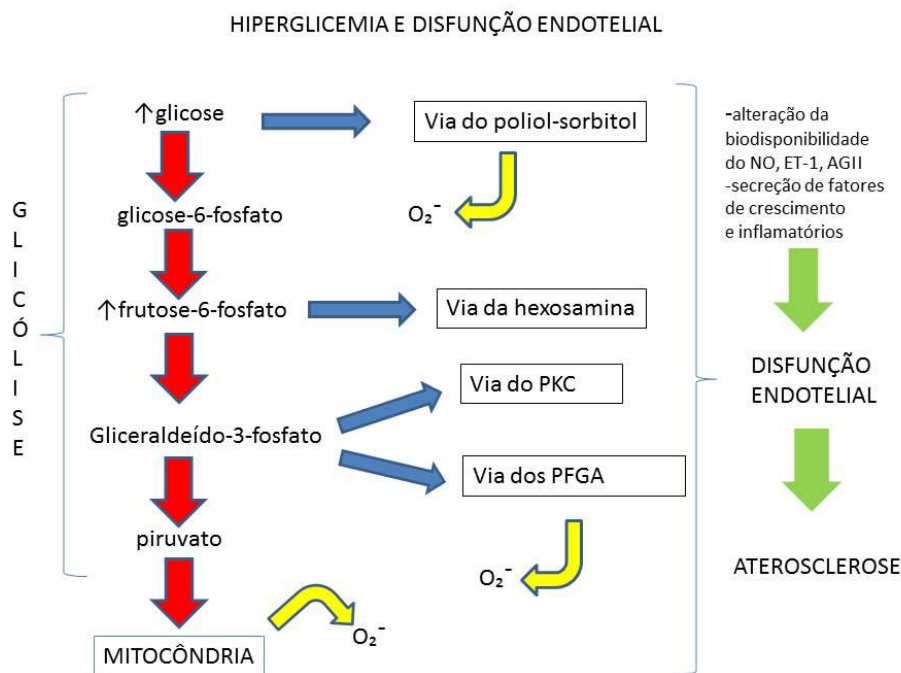


Figura 7 - Hiperglicemia e disfunção endotelial
Fonte: Adaptada de Giannini, 2011.

2.4.2. Ácidos graxos livres e disfunção endotelial

A elevação dos níveis séricos de Ácidos Graxos Livres (AGL), graças à lipólise aumentada nas células adiposas, em decorrência da deficiência de insulina, parece desempenhar um papel relevante na disfunção endotelial relacionada ao diabetes, ao determinar um aumento do estresse oxidativo e uma diminuição da síntese de NO nas células endoteliais (EGAN et al., 1999; KIM et al., 2005), além da ativação da PKC (WANG et al., 2006) e da indução de disfunção mitocondrial (BROWNLEE, 2005). Tanto em modelos animais como em humanos, a infusão aguda *in vivo* de AGL reduz a vasodilatação dependente do endotélio (STEINBERG et al., 2000; TRIPATHY et al., 2003). A infusão de AGL também reduz a atividade da eNOS basal estimulada pela insulina, assim como reduz a produção de NO pela célula endotelial em estudos *in vitro* (WANG et al., 2006).

A produção aumentada de ânions superóxidos, determinada pelos AGLs, ativa o fator NF-κ B pró-inflamatório, que por sua vez estimula a produção de outras citocinas inflamatórias como TNF-α e IL-6 (BROWNLEE et al, 2005; GAO et al., 2004). Além disso, os AGLs aumentam os níveis celulares de diacilglicerol e podem comprometer a fibrinólise (TOFT et al., 1997).

O fígado responde ao influxo de AGLs com o aumento na produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein* - VLDL) e síntese de colesterol, especialmente no DM2 (SNIDERMAN et al., 2001). Este aumento na produção de proteínas ricas em triglicerídeos, e a diminuição no *clearance* pela lipoproteína lipase resulta na hipertrigliceridemia, tipicamente observada no diabetes (CUMMINGS et al., 1995). As concentrações elevadas de triglicerídeos diminuem os níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein* - HDL) ao promover o transporte do colesterol da HDL para a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (SNIDERMAN et al., 2001). Essas anormalidades mudam a morfologia da lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* - LDL), aumentando a quantidade de LDLs mais densos, menores e mais aterogênicos (SNIDERMAN et al., 1978; DIMITRIADIS et al., 1995). Tanto a hipertrigliceridemia como os níveis baixos de HDL estão fortemente associados à disfunção endotelial (DE MAN et al., 2000; KUHN et al., 1991).

2.4.3. Mediadores endoteliais vasoconstritores e disfunção endotelial

A disfunção das células endoteliais no diabetes é caracterizada não apenas pela diminuição no NO, mas também pelo aumento na síntese de substâncias vasoconstritoras (DE VRIESE et al., 2000; O'DRISCOLL et al., 1997). Entretanto, com a biodisponibilidade do NO comprometida, mesmo a liberação fisiológica de agentes vasoconstritores pode tornar-se patológica (GIANNINI et al., 2011).

Vários mecanismos podem contribuir diretamente para o aumento na síntese e atividade da ANG-II e da ET-1, sob condições metabólicas diabéticas (GABRIELY et al., 2001). Os elevados níveis séricos de glicose aumentam a produção de ANG-II que contribui para a geração intracelular de superóxidos, por meio da ativação de NADPH oxidase (NICKENIG e HARRISON, 2002), e também promove a produção e liberação de ET-1. PFGAs aumentam diretamente a expressão endotelial de ET-1 pela ativação do transcrito pró-inflamatório NF- κ B. (GIANNINI et al., 2011). A ativação da PKC pelos PFGAs ou pelos AGLs aumenta a contratilidade da musculatura lisa vascular pela maior liberação de ET-1 e maior expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (SHEETZ e KING, 2002). A ET-1 pode ser particularmente relevante na fisiopatologia da doença vascular do diabetes, pois, além de levar à constrição, promove inflamação e crescimento da musculatura lisa da parede vascular (HOPFNER e GOPALAKRISHNAN, 1999)

2.5. Diabetes mellitus tipo 1 e o comprometimento da musculatura lisa vascular

O impacto do diabetes na função vascular não se limita ao endotélio (CREAGER et al., 2003). A desregulação da musculatura lisa está exacerbada devido ao comprometimento da função do sistema nervoso simpático (MCDAID et al., 1994). Além disso, o diabetes pode levar a um aumento na atividade da PKC, na produção do NF- κ B, e na geração de radicais livres na musculatura lisa vascular, com efeitos semelhantes aos desencadeados nas células endoteliais (INOGUCHI et al., 2000; HATTORI et al., 2000).

O diabetes aumenta também a migração de células da musculatura lisa vascular para as lesões ateroscleróticas em formação, onde se replicam e formam matriz extracelular, contribuindo para o aumento da lesão aterosclerótica madura (SUZUKI et al., 2001). A apoptose das células da musculatura lisa das lesões ateroscleróticas nos pacientes diabéticos é maior em relação a pacientes não diabéticos e, o fato de apresentarem menor quantidade de músculo liso em suas placas aumenta a propensão de ruptura das mesmas (FUKUMOTO et al., 1998). Do mesmo modo, a presença de citocinas pró-inflamatórias leva à diminuição na síntese de colágeno pelas células da musculatura lisa vascular e aumenta a produção de metaloproteinases matriciais (*Matrix Metalloproteinase* - MMP), contribuindo para a maior tendência à desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica nesses indivíduos (UEMURA et al., 2001).

2.6. Diabetes mellitus e estado pró-trombótico

A hiperglicemia intracelular induz nas plaquetas alterações semelhantes às produzidas nas células endoteliais: promovem um aumento na formação de ânions superóxidos, um aumento na atividade da PKC e uma diminuição do NO derivado da plaqueta (VINIK et al., 2001; ASSERT et al., 2001). Ao comprometer a homeostase do cálcio, a hiperglicemia altera também aspectos da ativação e agregação plaquetárias, alterando sua conformação e a liberação de mediadores (LI e BOSE, 2001).

A expressão aumentada de glicoproteínas no diabetes leva a um aumento na interação das plaquetas com o fator de Von Willebrand e com a fibrina (VINIK et al., 2001). Além disso, fatores de coagulação, como o fator VII e a trombina, e fatores coagulantes localizados nas lesões, como os fatores teciduais, estão aumentados; anticoagulantes endógenos, como a trombosmodulina e a proteína C estão diminuídos (HAFER-MACKO et al., 2002; CERIELLO et al., 1995; CERIELLO et al., 1990; KARIO et al., 1995); e a produção do PAI-1 e do inibidor da fibrinólise está aumentada (REN et

al., 2002; PANDOLFI et al., 2001). Dessa forma, a propensão à ativação e agregação plaquetária, associada a uma tendência a coagulação, aumentam significativamente o risco de trombose e ruptura da placa de aterosclerose no diabetes (CREAGER et al., 2003).

A figura 8 sumariza as alterações pró-trombóticas no diabetes.

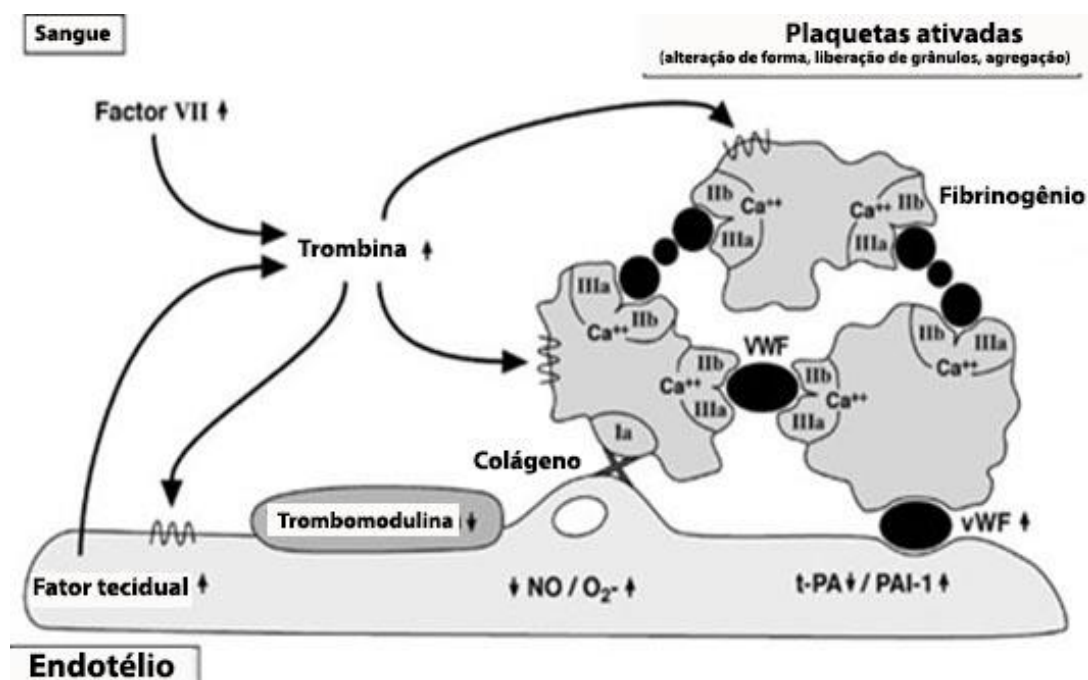


Figura 8 - Função plaquetária e fatores de coagulação no diabetes

A função plaquetária e os fatores de coagulação plasmática estão alterados no DM1, favorecendo a agregação plaquetária e a propensão à trombose. Há um aumento na expressão da glicoproteína Ib e IIb/IIIa, aumentando as interações plaqueta-VWF e plaqueta-fibrina. A biodisponibilidade do NO está diminuída; fatores de coagulação como o fator tecidual, fator VII e trombina estão aumentados; o PAI-1 está aumentado; e anticoagulantes endógenos como a trombomodulina estão diminuídos. VWF: fator de Von Willebrand, Ca⁺⁺: íon cálcio, NO: óxido nítrico, O₂⁻: radicais livres de oxigênio, t-PA: transcritor do ativador do plasminogênio, PAI: inibidor do ativador do plasminogênio.

Fonte: Creager e Lüscher, 2003

2.7. Diabetes mellitus e aterosclerose

Após o estabelecimento da disfunção endotelial e da inflamação vascular, o processo aterosclerótico, iniciado na infância tem continuidade de forma complexa e insidiosa, com manifestações clínicas evidentes apenas na vida adulta (MCGILL, 1988, ROSS, 1999; MCGILL et al., 2000). As artérias de grande e médio calibre representam os principais sítios de envolvimento da parede vascular, com uma ampla distribuição de lesões no coração, aorta, cérebro, rins e intestino delgado (MCGILL et al., 2000). O acúmulo de lipídios na camada íntima resulta em seu espessamento, formação da placa

ateromatosa, remodelamento vascular, e obstrução aguda e crônica do lúmen do vaso, levando a anormalidades do fluxo sanguíneo e diminuição do aporte de oxigênio aos órgãos alvos (WILLIAMS e TABAS, 1995).

O remodelamento da íntima leva à formação de uma matriz de proteoglicanos que sequestra LDLs circulantes e induz a sua oxidação (GUSTAFSSON e BOREN, 2004). As LDLs oxidadas constituem moléculas pró-inflamatórias que estimulam a expressão nas células endoteliais de moléculas de adesão como a ICAM-1 e a VCAM-1, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento, assim como citocinas inflamatórias como a IL-1 e o TNF- α (BAKKER et al., 2009). Embora os leucócitos circulantes não tenham aderência ao endotélio vascular normal, a expressão de várias classes de moléculas de adesão pelo endotélio lesado promove uma aderência seletiva de leucócitos e sua transmigração para o interior da parede vascular (BLAKE e RIDKER, 2002). Por intervenção sequencial de várias moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, selectinas) e citocinas quimiotáticas (NAKASHIMA et al., 1998; GU et al., 1998), monócitos circulantes são recrutados, ativados e diferenciados em macrófagos, os quais, ao absorver LDL oxidada, tornam-se células espumosas ingurgitadas de lipídios que formam as estrias da lesão gordurosa (QIAO et al., 1997). As células mononucleares liberam citocinas como IL-1 (MANTOVANI et al., 1992) e IL-6 (RUS et al., 1996) e as estrias da lesão gordurosa recrutam mais células inflamatórias (macrófagos, mastócitos, células T ativadas), resultando na captação e oxidação adicionais de LDLs (MANTOVANI et al., 1992; RUS et al., 1996). Devido ao efeito pro-inflamatório de fatores secretados pelos macrófagos e pelas células espumosas, as células da musculatura lisa proliferam e migram da camada média para a íntima (MANTOVANI et al., 1992). Estas células musculares ativadas sintetizam e secretam matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos) que levam à formação do fibroateroma (MANTOVANI et al., 1992). As placas fibrosas aumentam de tamanho com o tempo e podem evoluir com calcificação, hemorragia, ulceração, ruptura e trombose (LIBBY, 1995; LIBBY et al., 2002). A oclusão vascular por trombos determina doenças vasculares nos adultos como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou necrose tecidual (LIBBY, 1995; LIBBY et al., 2002). Na figura 9 observamos as etapas do processo aterosclerótico.

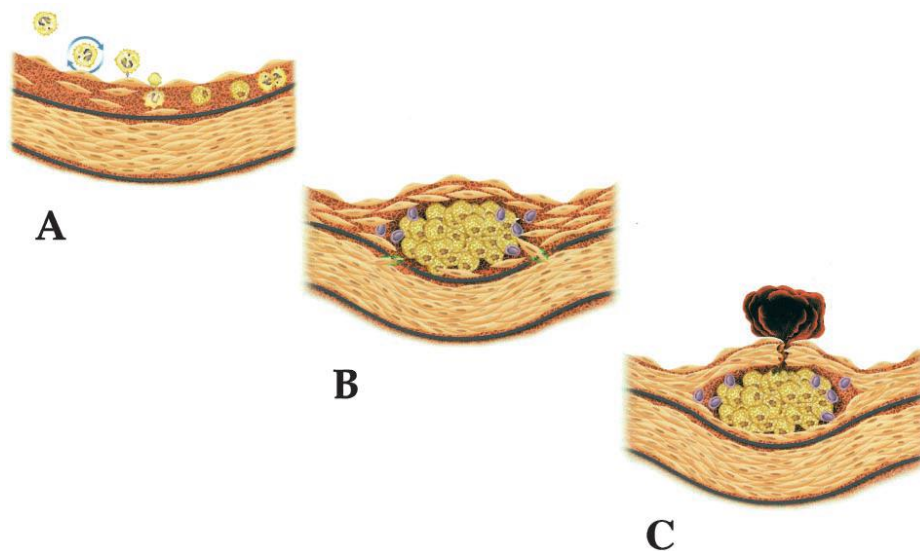


Figura 9 - Inflamação da parede arterial em todos os estágios da aterosclerose

A: recrutamento de leucócitos para a lesão aterosclerótica nascente na túnica íntima por ação de moléculas de adesão; formação de células espumosas pela captação de partículas de lipoproteínas modificadas; e replicação dos macrófagos, B: evolução da lesão com a chegada de linfócitos; produção de citocinas e fatores de crescimento que promovem a migração e proliferação de células musculares lisas para a íntima, C: degradação da elastina e do colágeno da matriz extracelular normal em resposta a estímulos inflamatórios, determinando um aumento da suscetibilidade à rotura da placa aterosclerótica; liberação de fatores teciduais pró-coagulantes que induzem a formação de trombos.

Fonte: Libby et al., 2002

2.8. Exames ultrassonográficos diagnósticos das alterações vasculares

Embora as complicações vasculares do diabetes não sejam clinicamente evidentes em crianças e adolescentes portadores da doença, o envolvimento vascular, sob a forma de comprometimento da função endotelial e aumento da espessura das camadas íntima-média da carótida, pode ser demonstrado nesses pacientes (NATHAN, 1993; CLARKSON et al., 1996). Para esse fim, exames de ultrassom de alta resolução são métodos não invasivos, passíveis de serem reproduzidos, e confiáveis para a detecção de alterações iniciais funcionais e estruturais de aterosclerose na parede arterial (JÄRVISALO et al., 2004).

2.8.1. Dilatação fluxo-mediada

A capacidade dos vasos sanguíneos de responder a estímulos físicos e químicos presentes em seu lúmen confere-lhe a habilidade de regular seu próprio tônus e ajustar o fluxo sanguíneo e sua distribuição em resposta a mudanças no meio ambiente local. Dessa forma, muitos vasos respondem a um aumento do fluxo sanguíneo, ou mais precisamente, a um estresse local, dilatando-se. Este fenômeno é designado Dilatação Fluxo-Mediada

(FMD) e seu principal mediador é o óxido nítrico produzido pelo endotélio (CORRETTI et al., 2002).

Tendo isso como base, na década de 90, uma técnica não invasiva ultrassonográfica foi desenvolvida para avaliar a FMD na artéria braquial, por meio da medida de seu diâmetro em resposta a um incremento do fluxo local (CELERMAJER et al., 1992; SORENSEN et al., 1995).

Numerosos fatores podem interferir na reatividade vascular fluxo-mediada como: temperatura, alimentação, drogas, estímulo simpático, entre outros. Por esse motivo, os participantes do exame devem estar, idealmente, em jejum de 8 a 12 horas e, ser avaliados em ambiente silencioso com temperatura controlada. Todas as drogas vasoativas devem ser suspensas por um período de pelo menos quatro meia-vidas antes do exame. Exercício físico e ingestão de substâncias estimulantes como a cafeína, alimentos com alto teor de gordura, alimentos ricos em vitamina C, bem como o uso de tabaco devem ser evitados nas 4-6 horas que antecedem o exame. Além disso, examinador deve ter conhecimento da fase do ciclo menstrual da participante, já que os níveis hormonais também podem afetar a FMD (HASHIMOTO et al., 1995).

A FMD representa, então, uma resposta fisiológica de vasodilatação reativa da artéria braquial após estímulo de hiperemia (HURKS et al., 2009), podendo ser visualizada e quantificada como um índice da função vasomotora (CORRETTI et al., 2002). Uma diminuição da tem sido demonstrada em indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, como crianças e adolescentes diabéticos (WIDLANSKI et al., 2003; JÄRVISALO et al., 2004), e apresenta valor preditivo de futura doença cardiovascular (SHIVALKAR et al., 2006).

A avaliação da resposta de FMD por ultrassom pode fornecer uma valiosa ferramenta para estratificação do risco do paciente pediátrico com *Diabetes mellitus* tipo 1 (HURKS et al., 2009).

2.8.2. Medida da espessura íntima-média da carótida

A medida da espessura das camadas íntima-média (IMT) da carótida pode ser usada como critério para avaliação de aterosclerose em qualquer estágio da doença, mesmo antes da formação de placas ateromatosas (LIND et al., 2012). O aumento na espessura das camadas íntima-média (IMT) da artéria carótida é considerado um marcador estrutural de aterosclerose em fase inicial, que se correlaciona com fatores de risco vasculares relacionados com a severidade e extensão da doença arterial coronariana,

e prediz a probabilidade de eventos cardiovasculares em grupos populacionais (JÄRVISALO et al., 2004).

O aumento da IMT tem sido observado em crianças com fatores de risco para aterosclerose, como hipercolesterolemia familiar (CELERMAJER et al., 1992; TONSTAD et al., 1996) e *Diabetes mellitus* (SINGH et al., 2003; JÄRVISALO et al., 2001). Importantes estudos como o *The Framingham Heart Study*, o *The Coronary Artery Risk Development in Young Adults* (CARDYA) e o *The Cardiovascular Health Study* evidenciam que o aumento da IMT da carótida apresenta forte associação com fatores de risco cardiovasculares (POLAK, 2012).

Múltiplos protocolos têm sido utilizados para avaliação da IMT da carótida desde 1986 (POLAK, 2012), no entanto, apesar de seu uso frequente em várias áreas de pesquisa em aterosclerose, não há um consenso quanto ao protocolo ideal (PETERS et al., 2012). Segundo Polak e Pencina (2012), o investimento de tempo e financiamento requerido em protocolos extensos parece não agregar valor adicional sobre os protocolos mais restritos.

2.9. Biomarcadores de disfunção endotelial e aterosclerose

Devido ao seu papel potencial na doença macrovascular diabética, marcadores biológicos circulantes podem contribuir com a oportunidade de diagnóstico precoce, além de contribuírem como alvo para novos tratamentos (GIANNINI et al., 2011). Entre o grande número de moléculas, fatores inflamatórios como a proteína C reativa (PCR), IL-6, e TNF- α , assim como marcadores de disfunção endotelial como a E-selectina, ICAM e VCAM solúveis, células progenitoras endoteliais circulantes, receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular, marcadores fibrinolíticos como o fibrinogênio, e as várias classes de MMP apresentam relevância potencial nesse sentido (GIANNINI et al., 2011).

A interleucina-6 é produzida por macrófagos ativos e linfócitos T e apresenta papel crítico na resposta imune e na resposta inflamatória aguda, estimulando a síntese de linfócitos B e a produção de citocinas, ao atuar sobre receptores específicos de membrana celular, além de induzir a síntese hepática de proteínas de fase aguda (RIDKER et al., 2000).

A PCR é produzida e liberada pelo hepatócito após estímulo das IL-1 e IL-6 e parece desempenhar importante papel como marcador de disfunção endotelial e inflamação: diminui a transcrição do RNA mensageiro da eNOS, reduzindo a formação de NO (VERMA et al. 2002a); aumenta a liberação de ET-1 e IL-6; favorece a liberação

de moléculas de adesão e citocinas quimiotáticas (VERMA et al., 2002b); e potencialmente aumenta a ativação do receptor da angiotensina-1 nas células da musculatura lisa, favorecendo sua proliferação e migração, produção de radicais livres e reestenoses (WANG et al., 2003). Constitui, então, não só um marcador, mas um contribuinte para a formação da lesão, ruptura da placa e trombose coronária, interagindo e alterando o fenótipo da célula endotelial (SZMITKO et al., 2003).

As proteínas inflamatórias de fase aguda são encontradas aumentadas em pacientes com DM1 (GOLDBERG, 2009). PCR, IL-6 e TNF α mostram-se independentemente associadas a eventos cardiovasculares e à microangiopatia no DM1 (SCHRAM et al., 2005), e achados similares são documentados para a E-selectina e o VCAM-1 que estão associados a retinopatia, albuminúria e doença coronariana (SOEDAMA-MUTHU et al., 2006).

O fibrinogênio mostra-se também fortemente associado com a progressão do IMT da carótida (COSTACOU et al., 2005), estados pró-trombóticos e doenças cardiovasculares, particularmente doença coronariana de instalação precoce (SNELL-BERGEON et al., 2010).

A ET-1 constitui um dos fatores constritores liberados pelo endotélio e tem sido associada, juntamente com a PCR, a IL-1 e o TNF- α , a um aumento na expressão endotelial de moléculas de adesão celular, contribuindo para o início do processo aterogênico (ZOUKI et al., 1999, SZMITKO et al., 2003). As moléculas VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina medeiam a adesão de leucócitos à parede vascular e assim como a ET-1 constituem importantes marcadores de disfunção endotelial (JOUSSEN et al., 2001). A medida dos níveis séricos da ET-1, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e fator de Von Willebrand tem sido amplamente utilizada para estimar o grau de disfunção endotelial (WIDLANSKY et al., 2003).

As MMP, sintetizadas no endotélio, musculatura lisa vascular e macrófagos, desempenham um importante papel na aterosclerose e remodelamento da parede vascular (BEAUDEUX et al., 2003). A expressão das MMP é aumentada por ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α , hormônios e fatores de crescimento (MURPHY et al., 1994). O meio hiperglicêmico do diabetes parece alterar a expressão de genes da MMP-2 e da MMP-9 nas células endoteliais e macrófagos (ALISON et al., 2003) e, na lesão vascular diabética, estas enzimas estão diretamente ligadas ao processo de hipertrofia da musculatura lisa, expansão da matriz extracelular, proliferação do endotélio e espessamento do complexo intima-média (VRANERS et al., 1999). Essas

enzimas participam ainda da formação e desestabilização das placas ateroscleróticas no DM1 e, o ponto chave desse fenômeno é a ativação da MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 e MMP-9 nas artérias comprometidas (ROGOWICZ et al., 2007). Além disso, o polimorfismo da MMP-9 parece contribuir para a ocorrência de eventos coronarianos (ROGOWICZ et al., 2007), e sua associação a baixos níveis séricos de HDL constitui importante fator de risco para infarto do miocárdio (POLLANEN et al., 2001).

3. OBJETIVO

Objetivo geral:

Verificar a presença de disfunção endotelial em crianças portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1.

Objetivos específicos:

- 1 - Observar a influência do tempo de diagnóstico de DM1 na disfunção endotelial
- 2 - Verificar a associação de disfunção endotelial com um estado inflamatório sistêmico e alterações estruturais iniciais de aterosclerose

Estratégias de ação:

- Utilizar técnicas ultrassonográficas para medir a dilatação fluxo-mediada (FMD) da artéria braquial e medir a espessura das camadas íntima-média das artérias carótidas (IMT).]
- Mensurar os níveis séricos de marcadores inflamatórios, marcadores de disfunção endotelial e de injúria vascular

4. MÉTODO

4.1. População

Participaram do estudo 31 crianças portadoras DM1, com idade 6-12 anos e tempo de diagnóstico variando de 1 mês a 9 anos (média $3,5 \pm 2,12$ anos); e 58 crianças saudáveis, com idade média 6-12 anos. As diabéticas foram recrutadas dos ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital da Criança de Brasília (HCB). As do grupo controle foram selecionadas entre parentes de funcionários dos hospitais envolvidos no estudo.

A fim de minimizar a influência de outros fatores na função endotelial, que não o DM1, seguimos alguns critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão para o DM1 foram: ausência de evidência de complicações microvasculares como retinopatia diabética, neuropatia ou microalbuminúria. Para os indivíduos controles os critérios de inclusão foram: peso e estatura adequados para a idade e gênero, glicose de jejum inferior a 100mg/dL, hemoglobina glicada (HbA1c) $\leq 5,6\%$ e PCR-US $\leq 0,3$ mg/dL. Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: início da puberdade, evidência de hipertensão arterial, dislipidemia (colesterol total superior ou igual a 200mg/dL, HDL inferior a 45mg/dL, LDL superior ou igual a 130mg/dL, VLDL superior ou igual a 41mg/dL, triglicerídeos superior ou igual a 100mg/dL até 10 anos de idade e superior ou igual a 130mg/dL acima dessa idade), antecedentes familiares de dislipidemia primária e morte prematura por doença cardiovascular ou cerebrovascular, presença de anemia (hemoglobina menor que 11g/L e hematócrito menor que 33%), vigência de quadros infecciosos agudos ou outras patologias crônicas que não o *Diabetes mellitus*, bem como o uso contínuo de medicações, que não a insulina (tabela 2).

Tabela 2 - Critérios de inclusão e exclusão para os grupos

Critérios de inclusão para o grupo de diabéticos:
- Ausência de complicações microvasculares
Critérios de inclusão para o grupo controle:
- Peso e estatura adequados para idade e gênero
- Glicose de jejum < 100mg/dL
- HbA1c ≤ 5,6%
- PCR-US ≤ 0,3mg/dL
Critérios de exclusão para ambos os grupos:
- Início da puberdade
- Hipertensão arterial
- Colesterol total ≥ 200mg/dL
- HDL < 45mg/dL
- LDL ≥ 130mg/dL
- VLDL ≥ 41mg/dL
- Triglicerídeos ≥ 100mg/dL
- Hemoglobina < 11g/dL
- Hematócrito < 33%
- Antecedentes familiares de dislipidemia primária
- Antecedentes familiares de morte prematura por DCV ou AVE
- Vigência de quadros infecciosos agudos
- Patologias crônicas, excluindo o DM1
- Uso contínuo de medicações, excluindo a insulina

DCV: Doença Cardiovascular, AVE: Acidente Vascular Encefálico

A exclusão de um participante diabético por alterações nos exames laboratoriais compatíveis com os critérios de exclusão reduziu o grupo de estudo de 32 para 31 indivíduos. Pelo mesmo motivo, 16 crianças foram eliminadas do grupo controle, assim como outras 4 que não compareceram a todos os exames propostos. Dessa forma, o grupo controle passou a contar apenas com 58 participantes dos 78 iniciais.

O estudo teve seu protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP-FS), antes de seu início. Além disso, um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos responsáveis de todos os participantes.

4.2. Estudos Ultrassonográficos

Duas técnicas ultrassonográficas foram realizadas sequencialmente em cada participante, sempre no período vespertino, em ambiente com temperatura controlada a 23°C, com baixa luminosidade. Os testes foram precedidos por repouso de 10 minutos, aferição da pressão arterial sistêmica com esfigmomanômetro pneumático, com manguito adequado para o tamanho do membro superior da criança, e instalação de eletrodos para a monitorização contínua com eletrocardiograma (ECG).

As crianças foram orientadas a evitar o consumo de alimentos ricos em gordura, vitamina C e estimulantes, tipo cafeína, bem como atividades físicas intensas nas 24h anteriores à realização dos exames (fatores que poderiam interferir na função endotelial).

4.2.1. Técnica de FMD da artéria braquial

De acordo com protocolos já estabelecidos por Corretti et al. (2002) e Barac, Campia e Panza, (2007), os participantes foram colocados em posição supina com o braço esquerdo em posição confortável para a localização da artéria braquial 5-15cm acima da fossa antecubital (figura 10). O manguito do esfigmomanômetro foi instalado no antebraço esquerdo.



Figura 10 – Foto demonstrando a posição do transdutor no membro superior, acima da fossa antecubital com instalação do manguito de pressão arterial no antebraço.

Fonte: Nicolau et al., 2010

Inicialmente, uma imagem da artéria braquial esquerda em plano longitudinal foi obtida e otimizada quanto à qualidade no modo bidimensional (2D) (figura 11), e gravada para posterior mensuração do diâmetro da artéria (4 medidas) em repouso no final da diástole, o que coincide com a onda R do complexo QRS do ECG contínuo (figura 11). O fluxo da artéria em repouso foi registrado por Doppler pulsado e analisado quanto aos seguintes parâmetros: índice de pulsatilidade (PI), índice de resistividade (IR), pico de velocidade sistólica (PS), velocidade no final da diástole (ED), razão pico de velocidade sistólica/velocidade no final da diástole (S/D), tempo de aceleração máxima (TA max) (figura 13).

Em seguida o manguito foi insuflado até 50 mm de Hg acima da pressão sistólica (CORRETTI et al., 2002; BARAC, CAMPIA e PANZA, 2007) por 3 minutos e rapidamente deflacionado. Novas imagens foram obtidas, sem que os parâmetros de operação do aparelho fossem alterados, com o transdutor mantido na mesma posição, após 1, 3, 5 e 9 minutos de deflação do manguito. Essas imagens também foram obtidas para mensuração do maior diâmetro (figura 12) e análise dos parâmetros do fluxo da artéria braquial (figura 14), do mesmo modo realizado no repouso. O diâmetro do lúmen do vaso foi definido como a distância entre as camadas íntimas das paredes proximal e distal do vaso (GIMÉNEZ et al, 2011) e a dilatação calculada com a média de 4 medidas do tempo de estudo com maior resposta vasodilador após isquemia, subtraída da média de 4 medidas do tempo basal. Os resultados foram expressos em porcentagem.

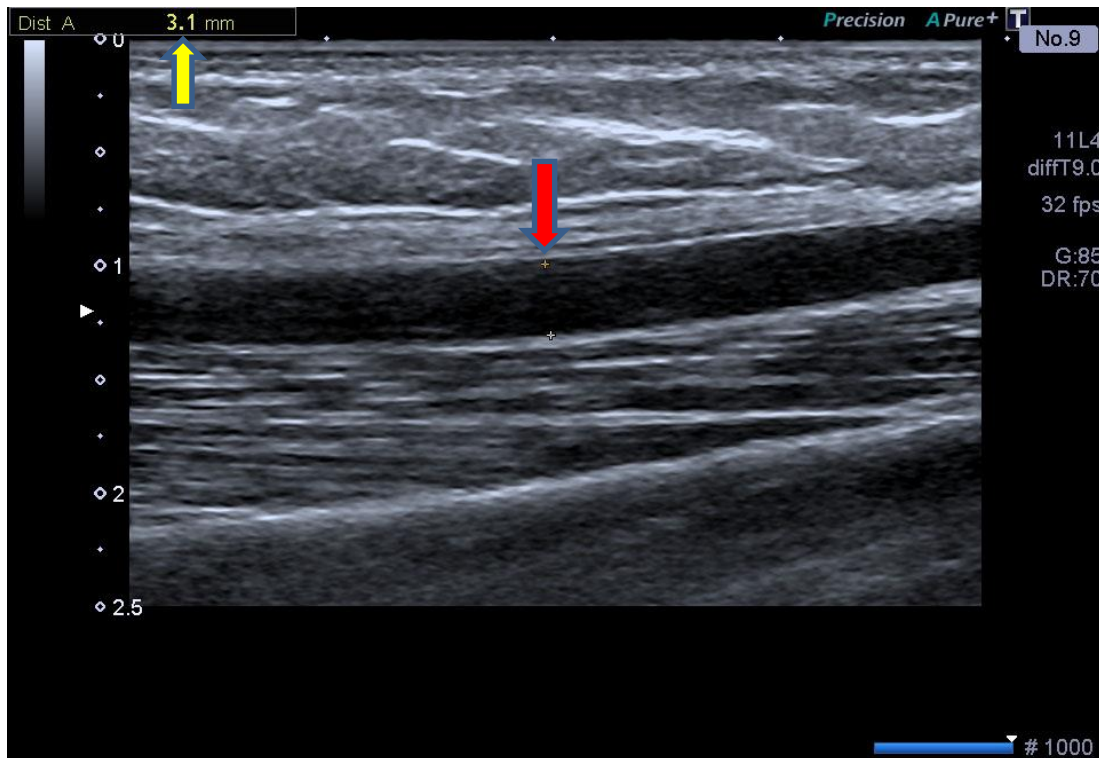


Figura 11 - Imagem ultrassonográfica da artéria braquial em repouso (modo bidimensional). A medida do maior diâmetro do vaso está evidenciada pelas setas vermelha e amarela.

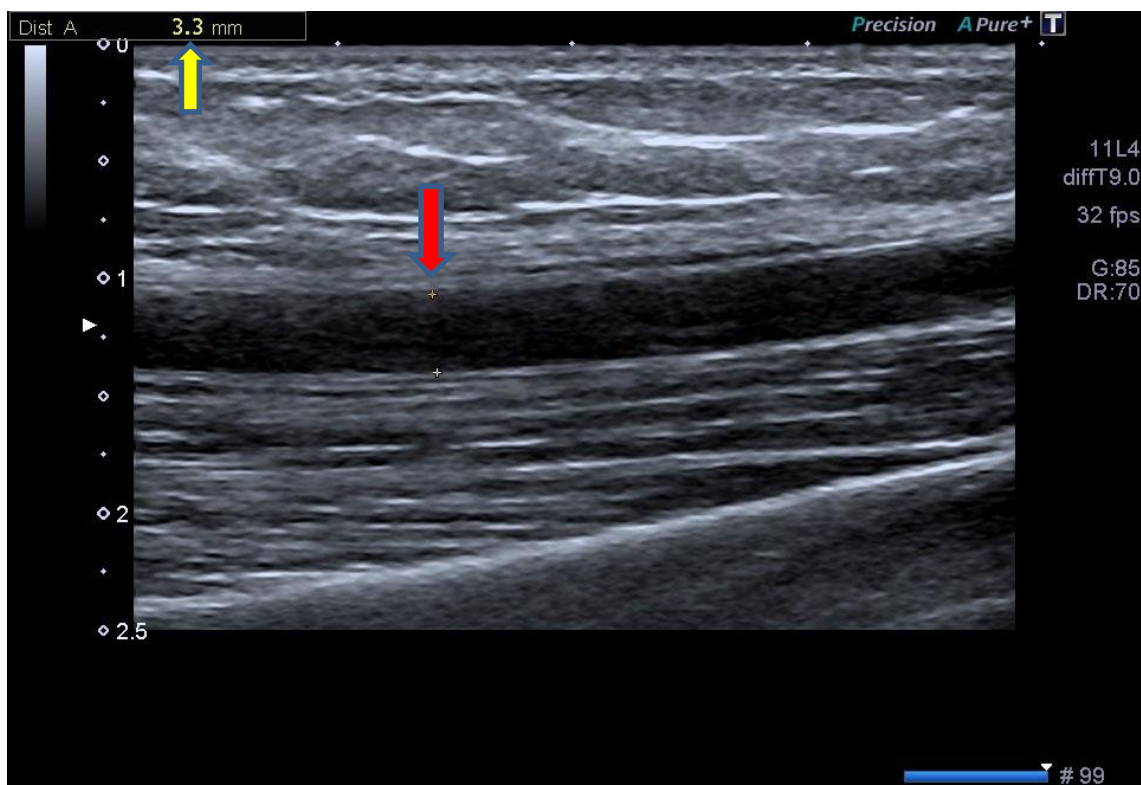


Figura 12 - Imagem ultrassonográfica da artéria braquial após estímulo hiperêmico (modo bidimensional). A medida do maior diâmetro do vaso está evidenciada pelas setas vermelha e amarela. Observa-se um aumento na medida em relação à do vaso em repouso.

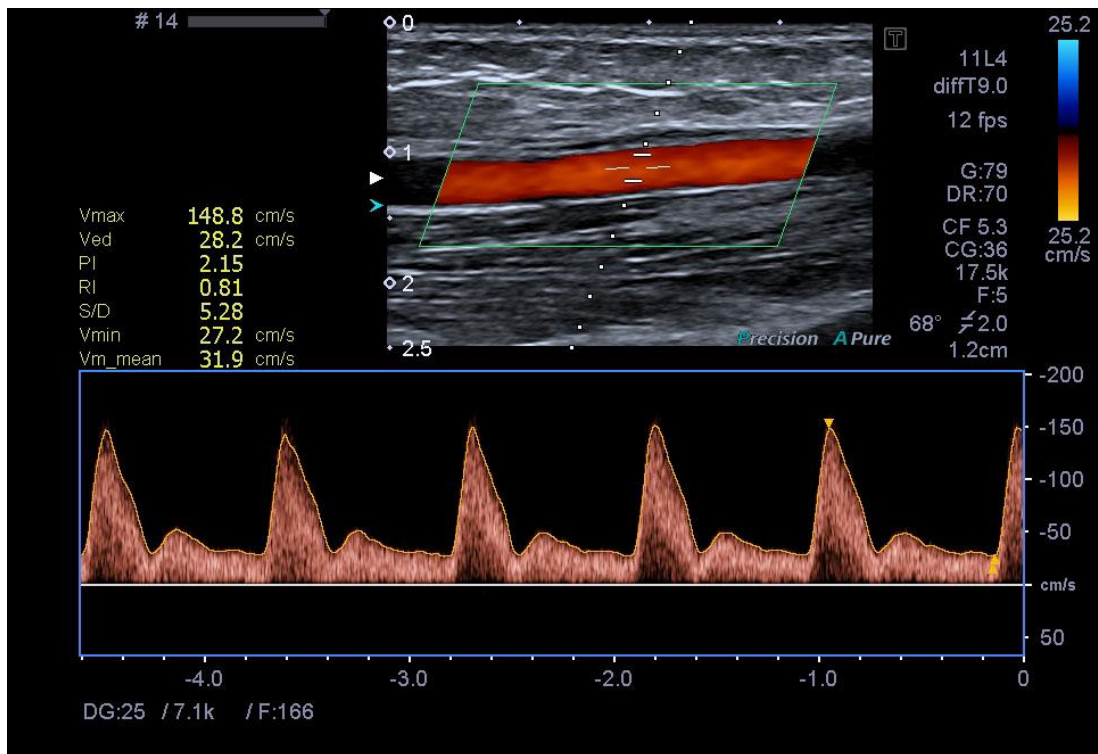


Figura 13 – Imagem ultrassonográfica do fluxo da artéria braquial em repouso em modo Doppler pulsado (abaixo).

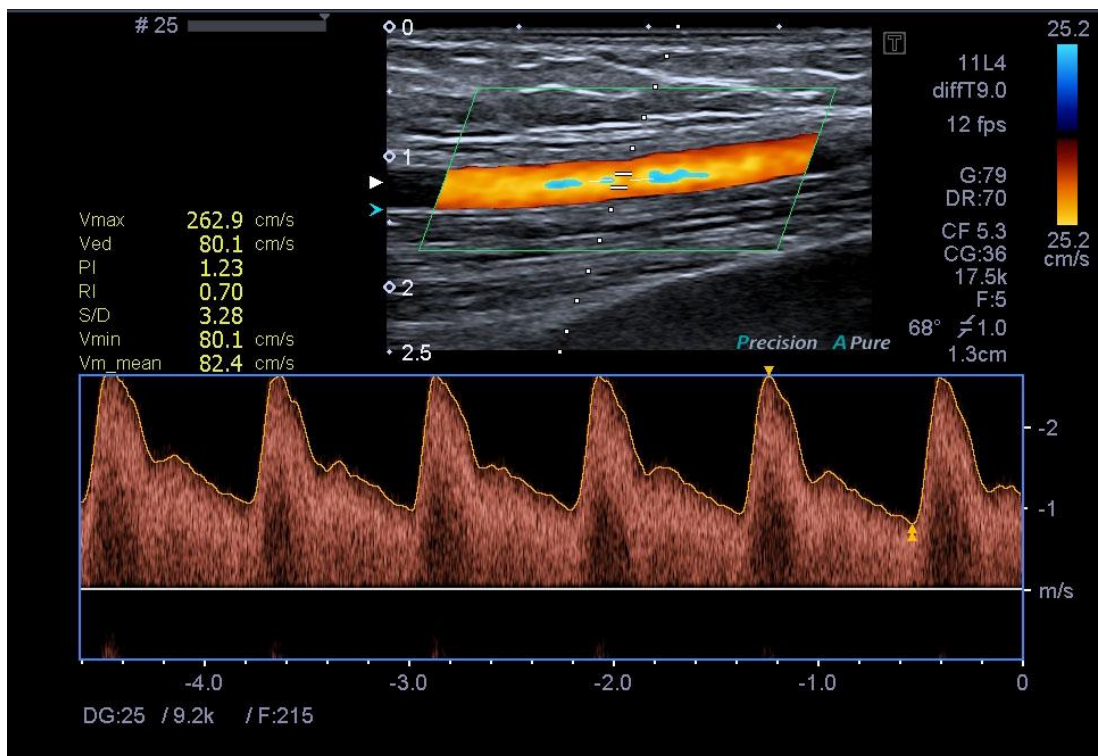


Figura 14 – Imagem ultrassonográfica do fluxo da artéria braquial após estímulo hiperêmico em modo Doppler pulsado (abaixo)

Além da resposta de dilatação e aumento do fluxo sanguíneo no vaso arterial estimulado (hiperemia reativa), as alterações esperadas no registro do Doppler pulsado são: um aumento na amplitude e alargamento da onda de pico sistólico e da onda de fluxo diastólico. O aumento na amplitude da onda de pico sistólico indica o aumento na velocidade de pico sistólico (PS) e seu alargamento uma diminuição na pulsatilidade (PI) e na resistividade (RI) do fluxo. O aumento na deflexão da onda de pico sistólico significa uma diminuição da aceleração do fluxo e, conseqüentemente, um aumento do tempo de aceleração máximo (TA max). As alterações na onda de fluxo diastólico representam um aumento na velocidade do fluxo no final da diástole (ED). Já a razão pico de velocidade sistólica/pico de velocidade no final da diástole (S/D) altera pouco seu valor em relação ao valor do repouso (figuras 13 e 14).

4.2.2. Técnica de IMT da carótida

Os participantes foram mantidos em posição supina com a cabeça lateralizada e o transdutor posicionado em ângulo aproximado de 45° sobre o vaso contralateral (figura 15).

Todas as medidas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito em estudos de JÄRVISALO et al. (2001) e BOTS et al. (1997). Optamos pelo protocolo mais simples, que utiliza uma projeção da artéria carótida comum (direita e esquerda), com medidas realizadas apenas na parede posterior, num total de quatro por paciente, em detrimento do protocolo mais complexo, que utiliza cinco projeções de três níveis da carótida (carótida comum, bifurcação e carótida interna), à esquerda e à direita, incluindo parede anterior e posterior, num total de 60 medidas por paciente.

Imagens das artérias carótida comum direita e esquerda foram obtidas no plano longitudinal em modo 2D, cerca de 1 a 2cm proximal à bifurcação da carótida (figura 16), para que quatro medidas da espessura das camadas íntima-média da parede posterior de cada uma das artérias pudessem ser realizadas no final da diástole (início do complexo QRS) (figura 17). A IMT foi definida como sendo a distância entre os limites lúmen-íntima e média-adventícia da carótida em mm, aferidas no ultrassom (GIMÉNEZ et al, 2011).

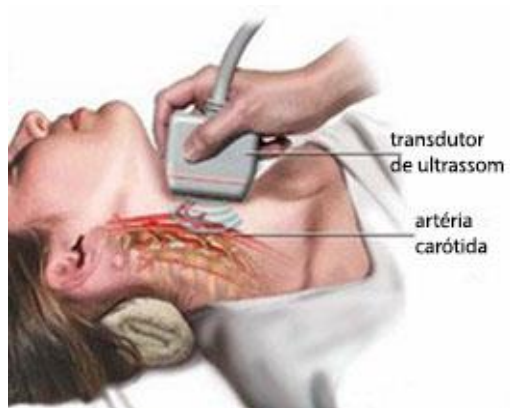


Figura 15 – Avaliação do IMT da carótida por ultrassom
 A gravura mostra a posição adequada do paciente e do transdutor para o exame.
 Fonte: <http://www.sononet.us/exams/wellexams/imtphysican.htm>

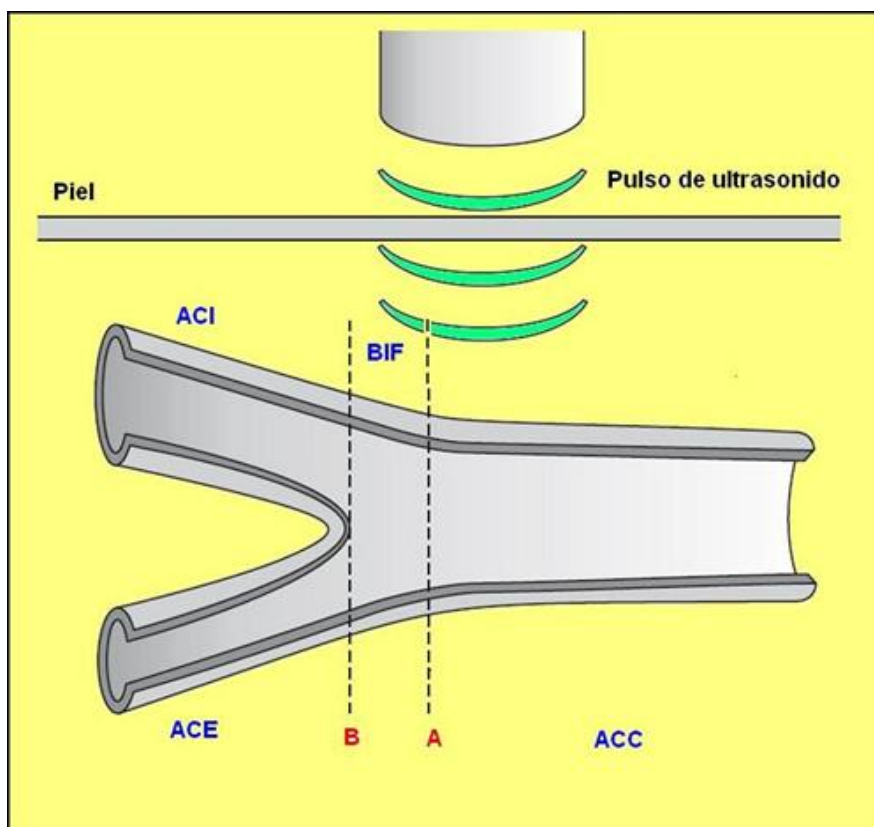


Figura 16 - Ilustração esquemática da artéria carótida comum (ACC), sua bifurcação (BIF) e seus segmentos interno (ACI) e externo (ACE).
 Observa-se, acima, a posição preconizada do transdutor para realização das medidas de IMT na parede distal da artéria.

Fonte: Protocol for the study of the intima-media thickness and platelets in carotid artery, 2012

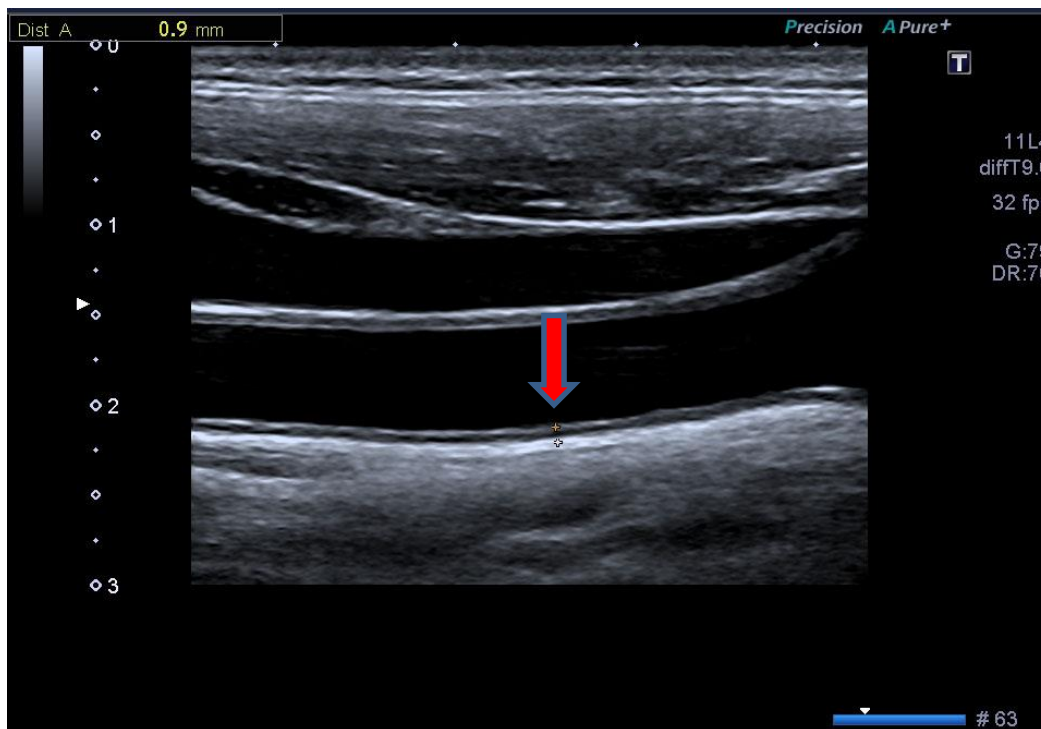


Figura 17 - Imagem ultrassonográfica em modo bidimensional da artéria carótida comum (vaso em posição inferior)
A seta vermelha ressalta uma medida da espessura das camadas íntima-média (IMT) da parede distal da artéria.

Todas as imagens dos estudos ultrassonográficos foram obtidas por um mesmo examinador, gravadas em aparelho de ultrassom, e analisadas em momento subsequente pelo mesmo examinador para a realização das medidas manualmente, com compasso ultrassônico (avaliação cega).

O equipamento utilizado foi um aparelho de ultrassom modelo ACUSON X 300 equipado com *software* vascular para imagens 2D, color e Doppler espectral, com monitor interno de eletrocardiograma e transdutor vascular de alta-frequência (VF13-5) (SIEMENS HG, Munique, Alemanha).

4.3. Exames laboratoriais

As amostras de soro e sangue total foram coletadas após 8h de jejum, de acordo com o padrão H3-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

As amostras de sangue foram armazenadas em tubos evacuados com gel e aditivados com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e utilizadas para a realização de hemograma completo e hemoglobina glicada (HbA1c).

As amostras de soro foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, utilizadas para avaliação do perfil lipídico (colesterol total, fração LDL, fração HDL, fração VLDL, triglicerídeos) e glicose (jejum), e armazenadas a -20°C até sua utilização para a dosagem posterior de: proteína C reativa ultrasensível (PCR-US), interleucina-6 (IL-6), Selectina Endotelial (E-selectina), Moléculas de Adesão Celular Intercelulares 1 (ICAM-1), Moléculas de Adesão Celular Vasculares 1 (VCAM-1), e o marcador de injúria vascular metaloproteinase matricial 9 (MMP-9).

Tabela 3 - Exames laboratoriais realizados

Exame	Amostra biológica	Equipamento e Fabricante	Metodologia	Valor de referência
Hemograma	Sangue total (EDTA)	Cell-dyn Ruby (Abbott, Illinois, EUA)	Citometria de Fluxo e Espectrofotometria	Adequado para a idade das crianças
Hemoglobina glicada	Sangue total (EDTA)	D-10™ Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	4,0 a 5,6%
Colesterol total	Soro	Architect c8000™ (Abbott, Illinois, EUA)	Espectrofotometria	<200mg/dL
Triglicerídeos	Soro	Architect c8000™ (Abbott, Illinois, EUA)	Espectrofotometria	<100mg/dL
HDL	Soro	Architect c8000™ (Abbott, Illinois, EUA)	Espectrofotometria	≥45mg/dL
LDL	Soro	Calculado	-	<130mg/dL
VLDL	Soro	Calculado	-	<41mg/dL
Glicose (jejum)	Soro	Architect c8000™ (Abbott, Illinois, EUA)	Espectrofotometria	<100mg/dL
PCR-US	Soro	BNII (Siemens®, Marburg, Germany)	Nefelometria	≤0,3mg/dL
IL-6	Soro	Equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha) Kit IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha)	ELISA Sanduíche indireto	<12,7pg/ml
E-Selectina	Soro	Equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha) Kit IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha)	ELISA Sanduíche direto	21-186ng/ml
ICAM-1	Soro	Equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha) Kit IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha)	ELISA Sanduíche direto	302-1115ng/ml
VCAM-1	Soro	Equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha) Kit IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha)	ELISA Sanduíche indireto	400,6-1340,8ng/ml
MMP-9	Soro	Equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha) Kit IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha)	ELISA Sanduíche indireto	2-139,4ng/ml

4.3.1. Hemograma

O hemograma foi realizado em contador hematológico automatizado Cell-dyn Ruby (Abbott, Illinois, EUA) que analisa 33 parâmetros, utilizando como metodologia a citometria de fluxo para análise das células da série branca, hemácias e plaquetas, e a metodologia espectrofotométrica para a determinação da hemoglobina. A presença de anemia foi avaliada de acordo com os critérios descritos anteriormente, respeitando-se os valores de referências compatíveis para a idade.

4.3.2. Hemoglobina glicada (HbA1c)

A dosagem de HbA1c foi realizada em equipamento D-10™ Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) que utiliza Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) por troca iônica. Nesse processo as amostras dos pacientes são diluídas automaticamente e injetadas na coluna analítica que proporciona um gradiente programado de tampão com força iônica crescente para a coluna, e promove a separação das hemoglobinas com base nas suas interações iônicas com coluna analítica. As hemoglobinas separadas passam através da célula de fluxo do fotômetro de filtro e são medidas a 415nm. O *software* do equipamento coleta os dados brutos de cada análise e, juntamente com os dados de calibração, quantifica os valores de HbA1c, gerando um relatório e um cromatograma para cada amostra analisada. Os valores de HbA1c considerados para inclusão dos indivíduos foram descritos anteriormente.

4.3.3. Colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e VLDL

A análise de colesterol total, triglicerídeos e a fração HDL foi realizada em equipamento Architect c8000™ (Abbott, Illinois, EUA) que utiliza a espectrofotometria como metodologia. Os *kits* utilizados nestas dosagens são enzimáticos e as demais frações LDL e VLDL foram calculadas utilizando a fórmula de Friedewald, comumente empregada pelos laboratórios de análises clínicas.

4.3.4. Glicose

A dosagem de glicose também foi dosada no equipamento Architect c8000™ (Abbott, Illinois, EUA) que utiliza a espectrofotometria como metodologia e um *kit* enzimático para a determinação desse analito.

4.3.5. PCR Ultrassensível (PCR-US)

A determinação da PCR-US foi realizada em equipamento BNII (Siemens®, Marburg, Germany) pela metodologia de nefelometria. Para este ensaio são utilizadas partículas de poliestireno revestidas com um anticorpo monoclonal específico contra a PCR humana que, quando incubadas com soro do paciente contendo PCR, formam aglutinados que dispersam a luz irradiada. A intensidade da dispersão de luz é dependente da concentração da proteína PCR na amostra. Os valores de referência teóricos sugeridos pelo fabricante e utilizados para as análises dos resultados foram até 0,3 mg/dL.

Para os analitos a seguir as dosagens foram realizadas em equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha), um sistema de processamento de ensaios de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em placas, totalmente automatizado, que permite a configuração de vários *kits* diagnósticos.

4.3.6. Interleucina-6 (IL-6)

Os níveis de IL-6 foram dosados utilizando-se o *kit* da marca IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha), um ELISA sanduíche indireto, onde anticorpos de revestimento anti-IL-6 humana são adsorvidos nos micropoços da placa, e aos quais ligam-se moléculas de IL-6 humana presentes na amostra ou no padrão. Em seguida, anticorpos anti-IL-6 humana conjugados com biotina são adicionados e ligam-se às moléculas de IL-6 humana capturadas pelos primeiros anticorpos. Após incubação, os anticorpos anti-IL-6 humana conjugados com biotina não ligados são removidos durante lavagem, e Estreptavidina-Peroxidase (HPS) é adicionada, ligando-se aos anticorpos anti-IL-6 humana conjugados com biotina. Após nova incubação, as moléculas de HPS não ligadas são removidas por lavagem, e uma solução de substrato da enzima contendo tetrametilbenzidina (TMB) é adicionada, formando um produto colorido proporcional à quantidade de IL-6 humana presente na amostra ou evidenciada no padrão. A reação é interrompida pela adição de ácido fosfórico 1M que torna a coloração amarela, e a absorvância é medida a 450 nm. Uma curva padrão é preparada a partir de sete diluições do padrão de IL-6 humana e uma curva *fit* é plotada para determinar a concentração da amostra de IL-6 humana.

4.3.7. Selectina Endotelial (E-selectina)

Para a dosagem de E-selectina, um *kit* específico da mesma marca foi utilizado. O ensaio é um ELISA sanduíche direto, onde anticorpos de revestimento anti-sE-selectina

humana são adsorvidos nos micropoços da placa de ELISA. As moléculas de E-selectina humana presentes nas amostras e nos padrões ligam-se a estes anticorpos adsorvidos e, em seguida, são adicionados anticorpos anti-E-selectina humana conjugados com HRP. Após incubação, os complexos não ligados são removidos por lavagem e uma solução de substrato da enzima contendo TMB é adicionada, formando um produto colorido proporcional à quantidade de E-selectina humana presente na amostra ou evidenciada no padrão. A reação é interrompida pela adição de ácido fosfórico 1M que torna a coloração amarela, e a absorvância é medida a 450 nm. Uma curva padrão é preparada a partir de 7 diluições do padrão de E-selectina humana e uma curva *fit* é plotada para determinar a concentração da amostra de E-selectina humana.

4.3.8. Moléculas de Adesão Celular Intracelulares 1 (ICAM-1)

Na dosagem de ICAM-1, outro *kit* da marca IBL International (IBL, Hamburgo, Alemanha) foi utilizado. Foi utilizada metodologia de ELISA sanduíche direto semelhante à empregada para a determinação E-selectina humana.

4.3.9. Moléculas de Adesão Celular Vasculares 1 (VCAM-1)

Para a determinação de VCAM-1, um *kit* específico, e da mesma marca já citada, foi utilizado. O ensaio é um ELISA sanduíche indireto, semelhante à metodologia descrita para a dosagem de IL-6.

4.3.10. Metaloproteinase-9 matricial (MMP-9).

A dosagem de MMP-9 utilizou um ELISA sanduíche indireto e um *kit* da mesma marca já citada. A metodologia descrita é semelhante à utilizada para a dosagem de IL-6.

4.4. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm desvio-padrão.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Teste Pearson Chi-Square, t de Student, ou testes de permutação (Kruskal-Wallis) foram usados para comparações do grupo de estudo com o controle e, quando aplicável, foram utilizados ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnnett* nas comparações entre os subgrupos de diabéticos e o controle, além de correlação de Pearson para quantificar a associação entre duas variáveis.

Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Características dos grupos e análises laboratoriais

As características do grupo controle e de diabéticos (DM1) quanto à distribuição por gênero, média de idade e perfil laboratorial, podem ser observadas na tabela 4.

Os dois grupos mostraram-se similares quanto à distribuição entre os gêneros e idade média. No entanto, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas no perfil laboratorial, quanto aos níveis de triglicerídeos e VLDL, com resultados dentro dos valores de referência, e quanto aos níveis de hemoglobina glicada e glicose de jejum, tendo o grupo DM1 apresentado níveis significativamente elevados em relação ao grupo controle.

Tabela 4 – Distribuição dos grupos (controle e DM1) quanto ao gênero, idade e parâmetros laboratoriais

Gênero	Controle (n=58)	Diabéticos (DM1) (n=31)	*p-value
Masculino	34 (58.6%)	19 (61.3%)	0,8068
Feminino	24 (41.4%)	12 (38.7%)	
Idade	8.36 (±1.81)	9.06 (± 1.77)	0,0817
Perfil Laboratorial	Controle Média (±DP)	Diabéticos (DM1)	*p-value
Hemoglobina	13.65 (±0.84)	13.70 (± 0.90)	0,8060
Hematócrito	40.26 (±2.97)	40.30 (± 2.32)	0,9402
Hemoglobina glicada	5.30 (±0.27)	9.04 (± 1.64)	0,0009x10 ⁻¹⁰
Colesterol Total	166.95 (±22.14)	165.42 (± 16.92)	0,7172
Triglicerídeos	63.80 (± 16,7)	60.23 (± 20.26)	0,0198
HDL	51.47 (± 9.70)	53.87 (± 8.66)	0,2357
LDL	101.95 (±18.06)	99.84 (± 17.09)	0,5884
VLDL	12.06 (±4.02)	14.40 (± 4.84)	0,0179
Glicose (jejum)	84.40 (±9.03)	187.16 (± 99.01)	0,0000026

*p-value obtido corresponde à comparação de médias entre os grupos utilizando teste *t de Student* e *Chi-Square*

A fim de verificar a influência do tempo de diagnóstico da doença nos níveis de HbA1c e glicose de jejum, o grupo DM1 foi separado em dois subgrupos: indivíduos com menos de 5 anos de diagnóstico da doença (DM1<5) e indivíduos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). As análises estatísticas revelaram que a comparação entre o grupo controle e o subgrupo DM1<5, para os parâmetros hemoglobina glicada ($p=0,015$) e glicose de jejum ($p=0,0002$), continuaram apresentando valor de p estatisticamente significativo. Do mesmo modo, na comparação do grupo controle com o subgrupo DM1≥5, os valores dos mesmos parâmetros, hemoglobina glicada ($p=0,018$) e glicose (jejum) ($p=0,002$), continuaram com um valor de p significativo (tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição do grupo controle e subgrupos de diabéticos quanto ao gênero, idade e parâmetros laboratoriais

Gênero	Controle (n=58)	Diabéticos (DM1) (n=31)	DM1 <5 (n=22)	DM1 ≥5 (n=9)	*p-value
Masculino	34 (58.6%)	19 (61.3%)	14 (63,6%)	5(55,6%)	0,8900
Feminino	24 (41.4%)	12 (38.7%)	8 (36,4%)	4 (44,4%)	
Idade	8.36 (±1.81)	9.06 (± 1.77)	8.64 (± 1.79)	10.11 (± 1.27)	-
	Controle Média (±DP)	DM1 total Média (±DP)	DM1 <5 Média (±DP)	DM1 ≥5 Média (±DP)	*p-value
Hemoglobina	13.65 (±0.84)	13.70 (± 0.90)	13.54 (± 0.81)	14.10 (± 1.03)	-
Hematócrito	40.26 (±2.97)	40.30 (± 2.32)	39.87 (± 2.25)	41.36 (± 2.26)	-
Hemoglobina glicada	5.30 (±0.27)	9.04 (± 1.64)	8.83 (± 1.56)	9.57 (± 1.79)	0,0150* 0,0180**
Colesterol Total	166.95 (±22.14)	165.42 (± 16.92)	165.27 (±17.53)	165.78 (±16.33)	-
Triglicerídeos	63.80 (± 16,7)	60.23 (± 20.26)	57.95 (± 18.35)	65.78 (±24.62)	-
HDL	51.47 (± 9.70)	53.87 (± 8.66)	51.59 (± 6.73)	59.44 (± 10.64)	-
LDL	101.95 (±18.06)	99.84 (± 17.09)	102.59 (±16.71)	93.11 (±17.05)	-
VLDL	12.60 (±3.33)	14.40 (± 4.84)	11.59 (± 3.69)	13.22 (±4.79)	-
Glicose (jejum)	84.40 (±9.03)	187.16 (± 99.01)	194.14 (±103.94)	170.11 (±89.11)	0,0002* 0,0020**

DM1<5: diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico, DM≥5: diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico
*p-value corresponde à comparação de médias (±DP) entre o grupo controle e DM1<5, e **p-value corresponde à comparação de médias e (±DP) entre o grupo controle e DM1≥5, utilizando teste *t Student*, *Chi-Square* e testes de permutação (Kruskal-Wallis).

5.2. Estudos ultrassonográficos

5.2.1. Resultados obtidos pela técnica de FMD

Para a técnica de FMD, os dois grupos estudados foram semelhantes quanto à média do diâmetro basal da artéria braquial, e quanto aos parâmetros de fluxo sanguíneo na artéria braquial em situação basal como: Índice de Pulsatilidade (PI), Índice de Resistência (RI), razão entre pico de velocidade Sistólica e pico de velocidade no final da Diástole (S/D), Pico Sistólico (PS), Pico Sistólico máximo (PS max), velocidade no Final da Diástole (ED) e Tempo de Aceleração máximo (TA max). No entanto, diferenças estatisticamente significantes ($p=0,0008$) foram encontradas quanto à percentagem de dilatação fluxo-mediada máxima (% FMD max) após estímulo hiperêmico, tendo o grupo de diabéticos apresentado resultados inferiores ao grupo controle (tabela 6).

A variável Tempo FMD max que analisa o tempo de estudo (1º, 3º, 5º ou 9º minutos) em que ocorreu a dilatação fluxo-mediada máxima, após o estímulo hiperêmico, revelou que em ambos os grupos, controle e DM1, o pico de FMD foi atingido no 3º minuto (tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros ultrassonográficos de FMD (controle e grupo de estudo)

Parâmetros analisados	Controle	Diabéticos (DM1)	<i>*p-value</i>
	Média (±DP)	Média (±DP)	
Diâm. art. braq.basal (mm) (média)	2.59 (± 0.13)	2.59 (± 0.13)	0,8873
% FMD max	11.45 (± 2.86)	9.29 (± 2.79)	0,0008
Tempo FMD max (min)	3 (± 1.13)	3 (± 1.69)	0,7535
PI basal	2.63 (± 0.44)	2.77 (± 0.56)	0,2378
RI basal	0.88 (± 0.06)	0.89 (± 0.05)	0,7927
S/D basal	11.43 (± 7.93)	12.58 (± 11.18)	0,6141
PS basal (cm/s)	126.65 (± 23.30)	131.22 (± 27.99)	0,4412
PS max basal (cm/s)	200.03(± 58,29)	188.18(± 49,18)	0,3143
ED basal (cm/s)	14.61 (± 7.10)	14.96 (± 8.29)	0,8423
TA max basal (cm/s ²)	43.30 (± 9.15)	43.13 (± 11.45)	0,9425

%FMD max: percentagem de dilatação fluxo-mediada máxima, Tempo FMD max: tempo em que ocorreu a máxima dilatação fluxo-mediada, PI: índice de pulsatilidade, RI: índice de resistividade, S/D: razão pico de velocidade sistólica/pico de velocidade diastólica, PS: pico sistólico, PS max: pico sistólico máximo, ED: velocidade no final da diástole, TA max: tempo de aceleração máximo. **p-value* obtido corresponde à comparação de médias entre os grupos controle e de diabéticos.

A fim de avaliar se o percentual de dilatação fluxo-mediada máxima (%FMD), após estímulo hiperêmico, apresentou variação de acordo com tempo de doença para o grupo de diabéticos (DM1), mais uma vez este grupo foi separado em dois subgrupos: diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1 <5) e diabéticos com 5 ou mais

anos de diagnóstico ($DM1 \geq 5$). Dessa forma, não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto à % FMD max entre o grupo controle e o subgrupo $DM1 < 5$ ($p = 0,078$), mas sim entre o grupo controle e o subgrupo $DM1 \geq 5$ ($p = 0,0001$), com valores inferiores neste subgrupo. O tempo em que ocorreu a dilatação máxima após estímulo não se alterou com a separação em subgrupos (tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros ultrassonográficos de FMD (controle, diabéticos e seus subgrupos)

Parâmetros analisados	Controle		Diabéticos (DM1)		<i>p-value</i>
	Média (±DP)	Média (±DP)	Média (±DP)	Média (±DP)	
	Controle	DM1 total	DM1 < 5	DM1 ≥ 5	
Diâm. art. braq.basal (mm) (média)	2.59 (± 0.13)	2.59 (± 0.13)	2.58 (± 0.13)	2.60 (± 0.13)	-
% FMD max	11.45 (± 2.86)	9.29 (± 2.79)	10.21 (± 2.7)	7.040 (± 1.38)	0,078* 0,0001**
Tempo FMD max (min)	3(± 1.13)	3(± 1.69)	3(± 1.81)	3(± 1.41)	-
PI.basal	2.63 (± 0.44)	2.77 (± 0.56)	2.75 (± 0.58)	2.81 (± 0.52)	-
RI.basal	0.88 (± 0.06)	0.89 (± 0.05)	0.89 (± 0.06)	0.88 (± 0.04)	-
S/D.basal	11.43 (± 7.93)	12.58 (± 11.18)	14.04 (± 12.89)	9.03 (± 3.53)	-
PS basal (cm/s)	126.65 (± 23.30)	131.22 (± 27.99)	130.5 (± 5.31)	132.98 (± 35.39)	-
ED basal (cm/s)	14.61 (± 7.1)	14.96 (± 8.29)	14.29 (± 8.6)	14.29 (± 7.69)	-
TA max basal (cm/s ²)	43.3 (± 9.15)	43.13 (± 11.45)	43.53 (± 11.66)	42.14 (± 11.54)	-
PS max (cm/s)	200,03 (± 58,29)	188,18 (± 49,18)	196.15 (± 53.56)	168.70 (± 30.63)	

DM1 < 5: diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico, DM ≥ 5: diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico, % FMD max: percentagem de dilatação fluxo-mediada máxima, Tempo FMD max: tempo em que ocorreu a máxima dilatação fluxo-mediada, PI: índice de pulsatilidade, RI: índice de resistividade, S/D: razão pico de velocidade sistólica / pico de velocidade diastólica, PS: pico sistólico, PS max: pico sistólico máximo, ED: velocidade no final da diástole, TA max: tempo de aceleração máximo. **p-value* corresponde à comparação de médias (±DP) entre o grupo controle e DM1 < 5, e ***p-value* corresponde à comparação de médias e (±DP) entre o grupo controle e DM1 ≥ 5, utilizando teste de permutação (Kruskal-Wallis).

Na figura 18 observa-se que o subgrupo $DM1 \geq 5$ apresentou resposta vasodilatadora inferior ao subgrupo $DM < 5$ e ao grupo controle em todos os tempos de exame e, no 3º min, o percentual de FMD máximo ou resposta vasodilatadora máxima foi significativamente menor em relação ao grupo controle ($p = 0,0038$).

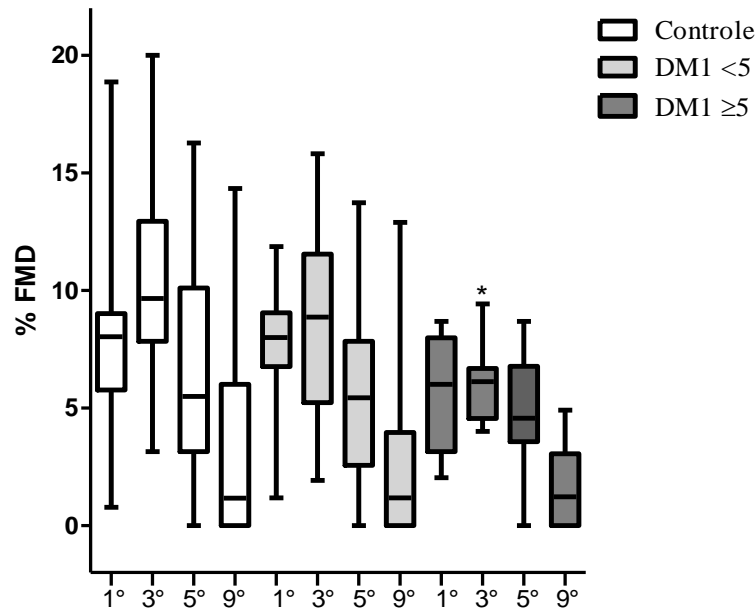


Figura 18 – Percentagem de dilatação fluxo-mediada (%FMD) nos quatro tempos estudados (1°, 3°, 5° e 9° minutos) após estímulo hiperêmico, nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Tukey*, comparando o 3°min de DM1≥5 com o 3°min do controle com um $*p = 0,0038$.

Embora a figura 19 sugira que, em todos os tempos (A, B, C, D), os participantes masculinos do grupo controle tenham apresentado uma maior resposta vasodilatadora ao estímulo hiperêmico, em relação aos participantes femininos deste grupo, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os gêneros. No entanto, no subgrupo DM1<5, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os gêneros, no 1° min após estímulo (figura 19A) ($p=0,023$), com uma resposta vasodilatadora maior nos indivíduos masculinos. No subgrupo DM1≥5 não se verificou diferença entre os gêneros, quanto à resposta vasodilatadora. Observamos ainda, que, no 1° minuto após estímulo (figura 19A), os indivíduos masculinos do subgrupo DM1≥5 apresentaram resposta vasodilatadora significativamente menor que os indivíduos masculinos do grupo controle ($p=0,02$) e que, após o 3° minuto (figura 19B), os indivíduos do sexo feminino do subgrupo DM1≥5 apresentaram este mesmo padrão de comportamento, em relação aos indivíduos femininos do grupo controle ($p=0,05$).

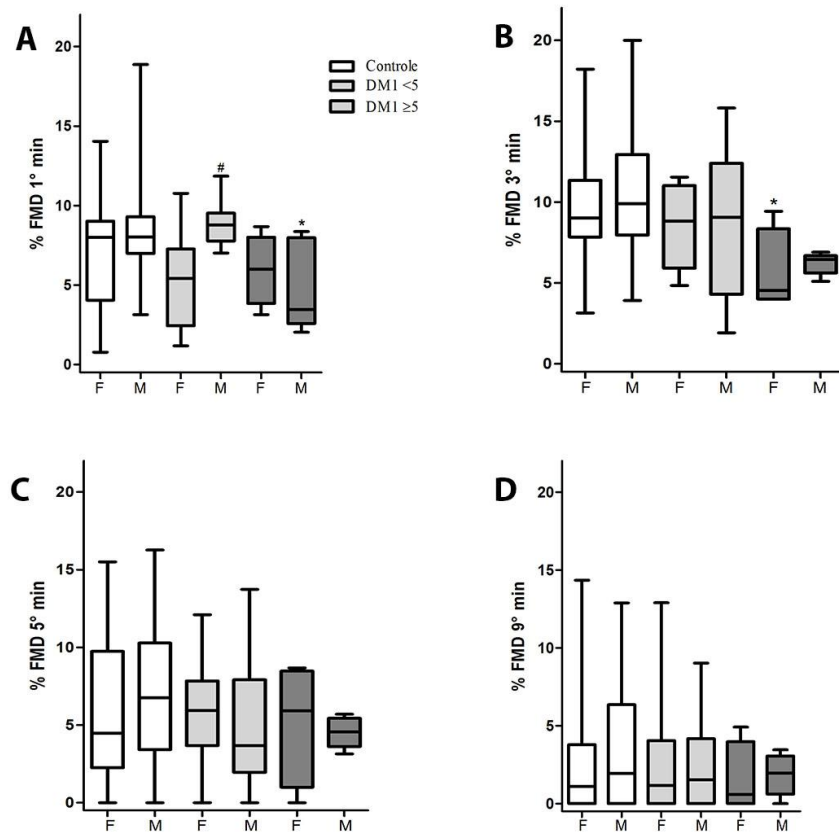


Figura 19 – Percentagem de dilatação fluxo-mediada (%FMD) avaliada em cada um dos quatro tempos após estímulo hiperêmico (1°, 3°, 5° e 9° minutos), segundo o gênero, nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos ≥ 5anos (DM1≥5). F: feminino, M: masculino. Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnnett*, (A) comparando o grupo controle com o grupo DM1≥5 do sexo masculino no 1°min * $p = 0,02$, e um teste *t Student* mostrou diferenças entre os sexos no grupo DM1<5, com # $p = 0,023$, (B) comparando o grupo controle com o grupo DM1≥5 anos de diagnóstico do sexo feminino no 3°min revelou um $p = 0,05$. Nos tempos de estudo (C) e (D) não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos e sexos

As figuras de 20 a 26 comparam o desempenho do fluxo arterial braquial, durante cinco tempos de estudo (basal, 1min, 3 min, 5 min e 9 min), após estímulo hiperêmico, nos 3 grupos (controle, DM1<5 e DM1≥5), quanto aos parâmetros: PI (figura 20), RI (figura 21), PS (figura 22), percentual de aumento máximo do PS (figura 23), ED (figura 24), S/D (figura 25), TA max (figura 26).

Quando avaliamos o PI (figura 20), apenas o subgrupo DM1<5 apresentou resposta de decréscimo em seus valores com o aumento do fluxo local, no 1º min. Neste subgrupo, os valores de PI, nos 1º e 3º minutos, foram inferiores em relação ao controle, com diferenças estatisticamente significantes ($p=0,05$ nos dois tempos). Os demais grupos (controle e DM1≥5) não apresentaram o comportamento esperado de queda no PI com a resposta vasodilatatória, sem diferenças estatisticamente significantes.

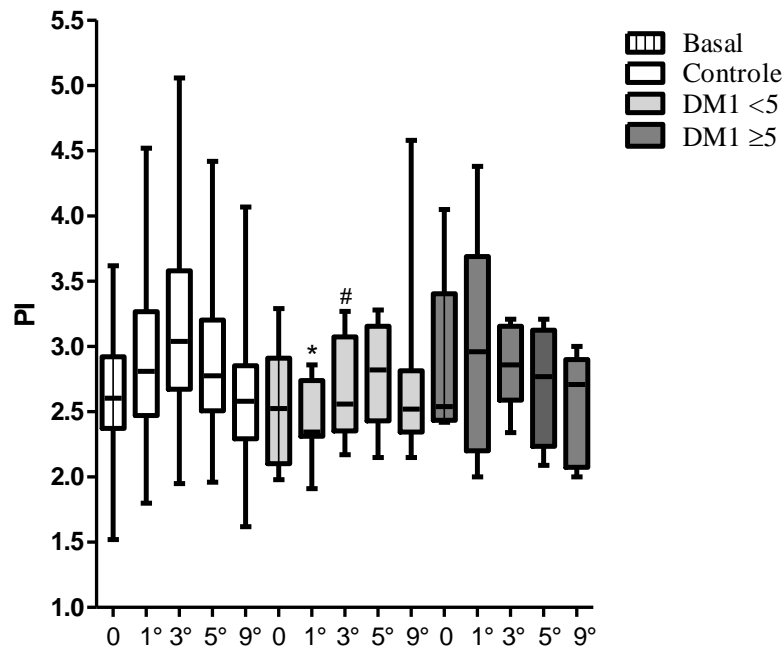


Figura 20 – Índice de pulsatilidade (PI) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnett* * $p = 0,05$ comparando o grupo controle com o grupo DM1<5 no 1ºmin e no 3ºmin com # $p = 0,05$

Na figura 21 observa-se que o RI também não apresentou a redução esperada em seus valores em consequência da vasodilatação e aumento do fluxo local, tendo permanecido praticamente inalterado em todos os tempos do exame, de forma semelhante no controle e subgrupos de diabéticos.

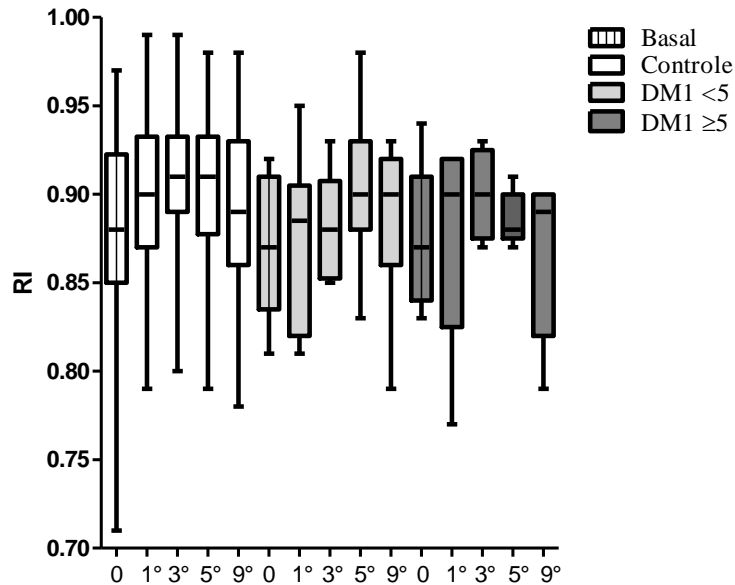


Figura 21 – Índice de resistividade (RI) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico estudados (1°, 3°, 5° e 9° minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Ao avaliarmos o PS (figura 22), parece ter ocorrido o acréscimo esperado em seus valores com o aumento da resposta vasodilatatória, após estímulo, em todos os grupos, sem diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos. No entanto, o subgrupo DM1<5 apresentou valores maiores que o controle, de forma estatisticamente significativa, no 9° min, sugerindo um retorno mais tardio do fluxo ao nível basal neste subgrupo, em relação ao controle.

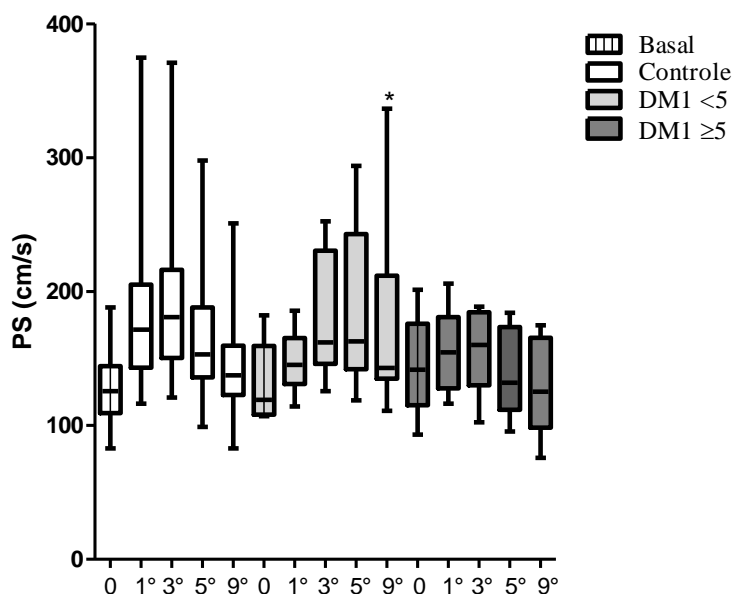


Figura 22 – Velocidade de pico sistólico (PS) do fluxo da artéria braquial no repouso (tempo 0 ou basal) e após estímulo hiperêmico nos quatro tempos estudados (1°, 3°, 5° e 9° minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 anos ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5).

Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnnett* * $p=0,0034$ comparando o grupo controle com o grupo DM1<5 no 9°min.

A figura 23 mostra um percentual de aumento máximo do PS maior no grupo controle, seguido do subgrupo DM1<5 e este do subgrupo DM1≥5, entretanto, sem diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos.

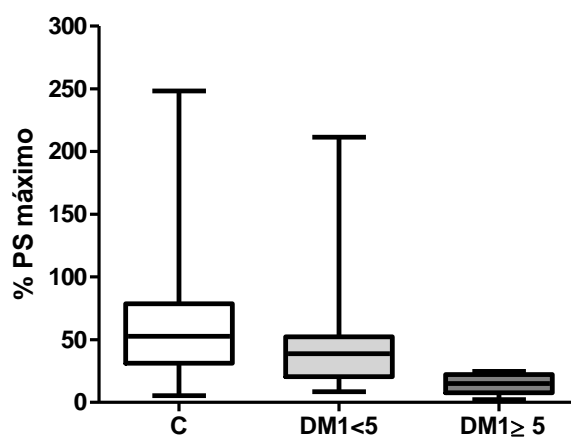


Figura 23 – Percentual máximo de aumento da velocidade do pico sistólico (PS) do fluxo da artéria braquial após estímulo hiperêmico nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Ao observar-se a figura 24, o grupo controle e o subgrupo DM1<5 parecem apresentar um aumento da ED, no 1ºmin após o estímulo hiperêmico, conforme o esperado, não observando-se o mesmo no DM1≥5, porém, sem diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos.

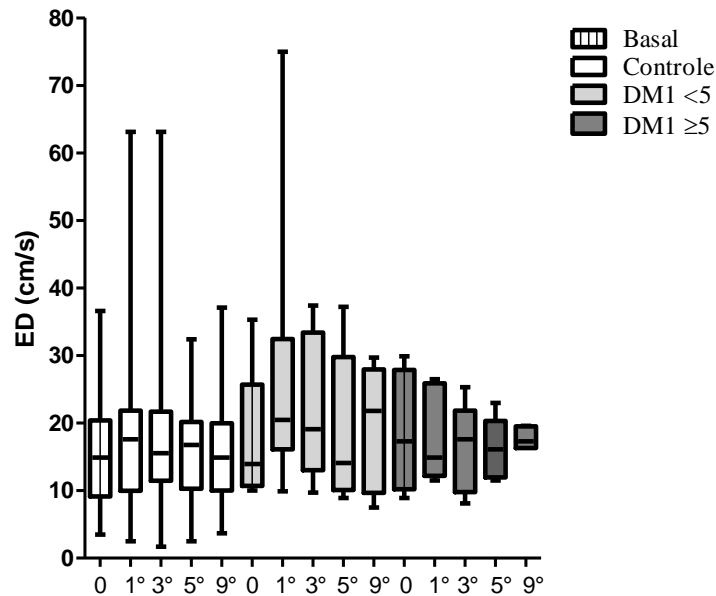


Figura 24 – Velocidade no final da diástole (ED) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico estudados (1º, 3º, 5º e 9º minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Os valores de S/D mantiveram-se praticamente estáveis em todos os tempos de exame, no grupo controle e subgrupos de diabéticos, de forma semelhante, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos (figura 25).

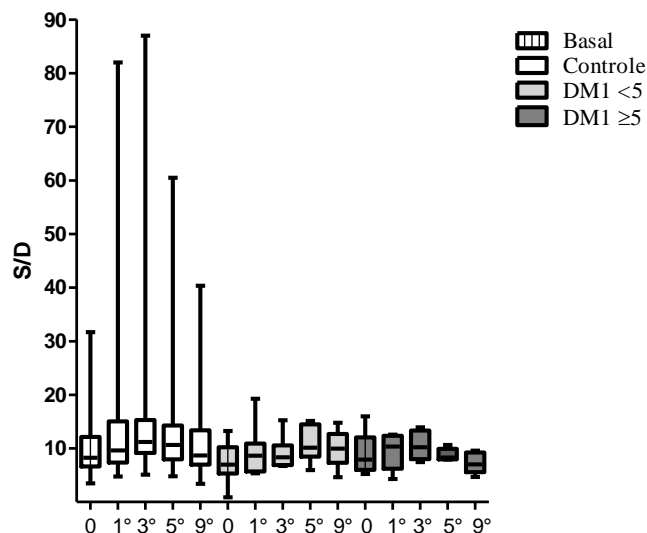


Figura 25 – Razão velocidade de pico sistólico/velocidade no final da diástole (S/D) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos estudados (1°, 3°, 5° e 9° minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

A figura 26 sugere um aumento nos valores de TA max, após o estímulo no grupo controle e em menor escala no subgrupo DM1<5, seguido do DM1≥5. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

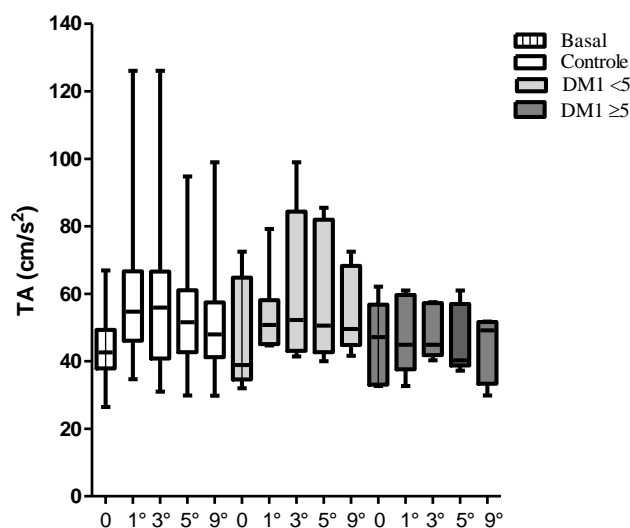


Figura 26 – Tempo de aceleração máxima (TA max) do fluxo da artéria braquial em repouso (tempo 0 ou basal) e nos quatro tempos após estímulo hiperêmico estudados (1°, 3°, 5° e 9° minutos), nos grupos: controle, diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

5.2.2. Resultados obtidos pela técnica de medida da IMT

Quando a medida da espessura das camadas íntima-média (IMT) das carótidas direita e esquerda foi avaliada, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (tabela 8).

Tabela 8 – Medidas da IMT da carótida por ultrassonografia (controle e DM1)

	Controle		Diabéticos (DM1)	
Parâmetros analisados IMT	Média (±DP)	Média (±DP)	Média (±DP)	*p-value
IMT. CE.méd.	0.55 (± 0.04)	0.56 (± 0.06)	0.56 (± 0.06)	0,7625
IMT. CD méd.	0.55 (± 0.05)	0.56 (± 0.04)	0.56 (± 0.04)	0,3596
IMT.máx.CD e CE(mm)	0.61 (± 0.06)	0.61 (± 0.05)	0.61 (± 0.05)	0,8263

IMT: espessura íntima-média, CE; carótida esquerda, CD: carótida direita.

*p-value corresponde à comparação de médias (±DP) entre o grupo controle e DM1<5, e **p-value corresponde à comparação de médias (±DP) entre o grupo controle e DM1≥5, utilizando teste de permutação (Kruskal-Wallis).

A fim de verificar-se a interferência do tempo de doença sobre a IMT das carótidas, o grupo de DM1 foi novamente separado em dois subgrupos (DM1<5 e DM1≥5), e os resultados obtidos não evidenciaram uma relação entre a IMT das carótidas e o tempo de doença em nossa população, tendo o grupo controle e os subgrupos diabéticos permanecido com valores similares (tabela 9).

Tabela 9 – Medidas da IMT da carótida por ultrassonografia (controle e subgrupos DM1)

Parâmetros analisados DFM	Controle		Diabéticos (DM1)		p-value
	Média (±DP)	Média (±DP)	Média (±DP)	Média (±DP)	
	Controle	DM1 total	DM1<5	DM1≥5	
IMT. CE méd.	0.55 (± 0.04)	0.56 (± 0.06)	0.55 (± 0.05)	0.57 (± 0.08)	0,737*
IMT. CD méd.	0.55 (± 0.05)	0.56 (± 0.04)	0.56 (± 0.04)	0.54 (± 0.05)	0,185*
IMT.máx.CD e CE(mm)	0.61 (± 0.06)	0.61 (± 0.05)	0.6 (± 0.04)	0.63 (± 0.07)	0,628*
					0,252**

IMT: espessura íntima-média, CE; carótida esquerda, CD: carótida direita. *p-value corresponde à comparação de médias (±DP) entre o grupo controle e DM1<5, e **p-value corresponde à comparação de médias (±DP) entre o grupo controle e DM1≥5, utilizando teste de permutação (Kruskal-Wallis).

5.3. Análises laboratoriais específicas

Os níveis séricos de interleucina-6 e PCR-US foram dosados com o objetivo de verificar a presença de um estado inflamatório nos indivíduos diabéticos dos subgrupos DM1<5 e DM1≥5.

Na figura 27 observa-se que o grupo controle e os subgrupos de diabéticos apresentaram níveis séricos de IL-6 dentro dos valores de referência e sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

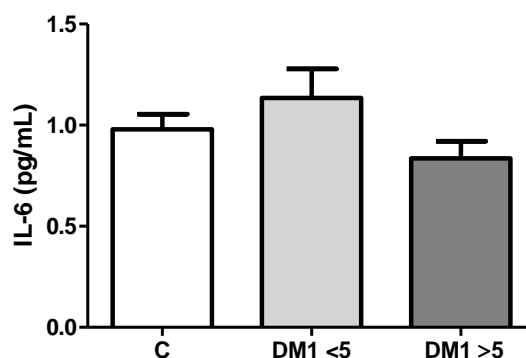


Figura 27 - Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6) nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Valores de referência: <12,7pg/ml.

Entretanto, na figura 28, ao analisarmos os níveis de PCR-US de todos os grupos, considerando o valor de referência de 0,3 mg/dL, observamos uma discreta elevação de PCR-US no subgrupo de diabéticos DM≥5, com diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle.

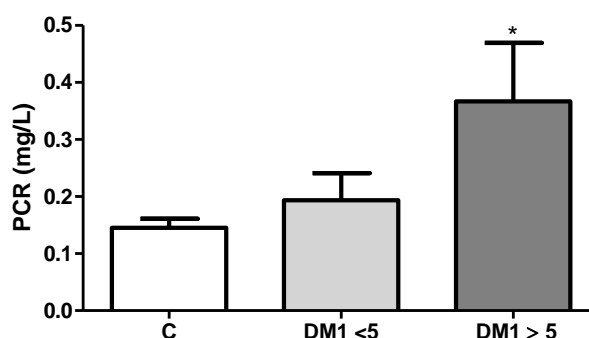


Figura 28 - Níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (PCR-US) nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM≥5). Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnnett*, comparando DM1≥5 com C, com * $p=0,0026$. Valor referência ≤ 0,3mg/dL.

A fim de verificar a presença de marcadores sugestivos de disfunção endotelial nos indivíduos com DM1, comparados ao grupo controle, mensuramos os níveis séricos das moléculas de adesão E-Selectina, sVCAM-1 (VCAM-1 solúvel) e sICAM-1 (ICAM-1 solúvel).

A figura 29 mostra os níveis séricos de E-Selectina encontrados e, considerando os valores de referência indicados pelo fabricante na informação técnica do *kit* 21-186 ng/mL, todos os grupos apresentaram resultados acima deste intervalo. No entanto, comparando-se os valores dos grupos estudados, observamos que o subgrupo DM1 \geq 5 apresentou níveis superiores aos outros dois grupos, com diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao grupo controle.

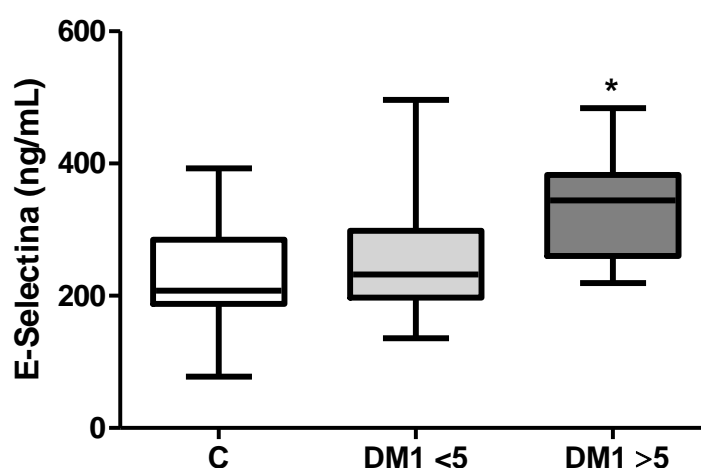


Figura 29 - Níveis séricos E-selectina nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1 \geq 5). Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnnett*, comparando DM1 \geq 5 com C, com $*p=0,001$. Valores de referência 21-186 ng/mL.

Na figura 30 avaliamos os níveis séricos de sVCAM e, diferentemente da análise anterior, os resultados do grupo controle mostraram-se dentro dos valores de referência estabelecidos pelo *kit*: 400,6-1340,8 ng/mL. Entretanto, os dois subgrupos de DM1 apresentaram resultados acima dos valores de referência, com diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo controle.

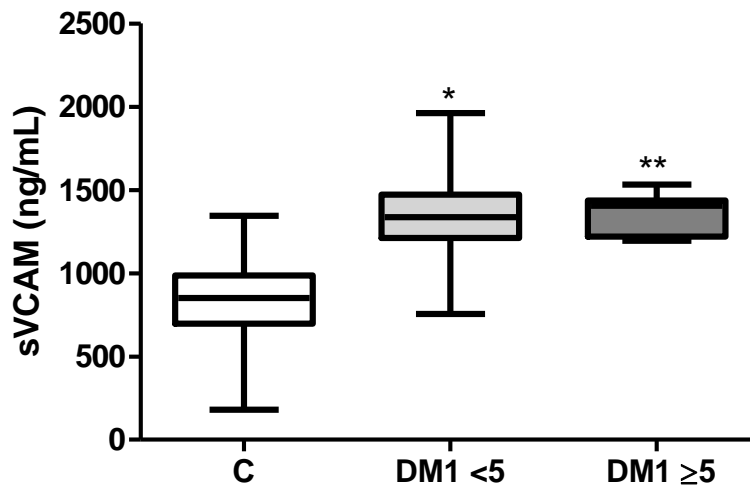


Figura 30 - Níveis séricos sVCAM nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de uma via e pós-teste de *Dunnnett*, comparando DM1<5 e DM1≥5 com C, com * p e ** p = 0,0001. Valores de referência: 400,6-1340,8 ng/mL.

A figura 31 revela que todos os grupos apresentaram níveis séricos de sICAM dentro dos valores de referência, sem diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos.

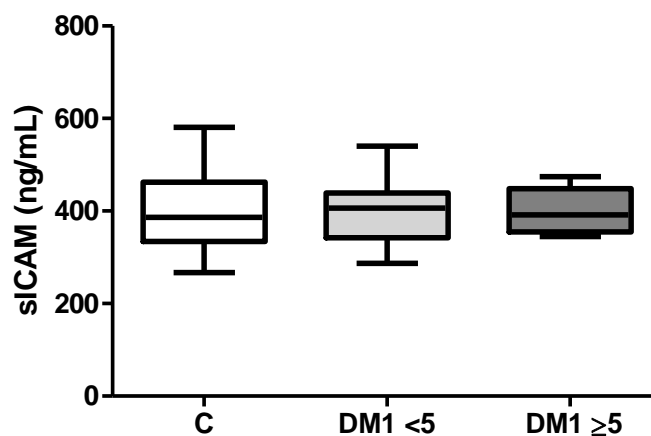


Figura 31 - Níveis séricos sICAM nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Valores de referência 302-1115ng/mL.

Para avaliar a presença de marcadores sugestivos de remodelamento vascular do processo aterosclerótico dosamos os níveis séricos da enzima MMP-9 no grupo controle e subgrupos de diabéticos.

Na figura 32, observamos que todos os grupos apresentaram níveis séricos de MMP-9 dentro dos valores de referência, sem diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos,

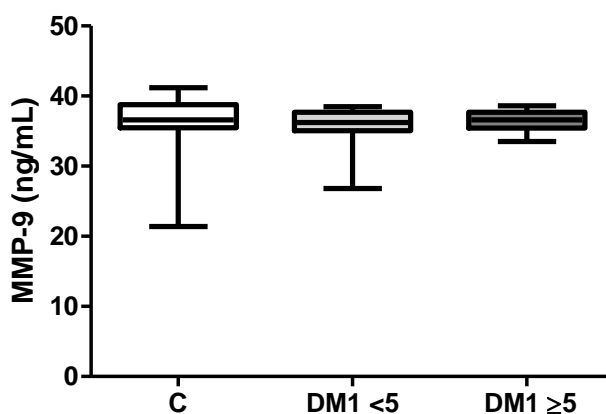


Figura 32 - Níveis séricos de metaloproteinase-9 (MMP-9) nos grupos: controle (C), diabéticos com menos de 5 anos de diagnóstico (DM1<5) e diabéticos com 5 ou mais anos de diagnóstico (DM1≥5). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Valores de referência: 2-139,4 ng/mL.

5.4. Correlação entre variáveis

Com o objetivo de verificar a correlação entre o %FMD e os marcadores que apresentaram elevações significativas em seus níveis séricos nas análises específicas, utilizamos a correlação linear de Pearson que avalia a correlação entre duas variáveis mensuráveis. Este teste não evidenciou correlação linear entre %FMD e PCR-US ($r = -0,16$) (figura 33), %FMD e sE-selectina ($r = -0,13$) (figura 34) ou %FMD e sVCAM-1 ($r = -0,099$) (figura 35).

No entanto, ao avaliarmos a correlação linear de Pearson entre o %FMD e HbA1c ($r = -0,35$) (figura 36), o %FMD e glicose de jejum ($r = -0,35$) (figura 37), e o %FMD e o tempo de diagnóstico ($r = 0,09$) (figura 38) observamos uma moderada correlação negativa entre estas variáveis.

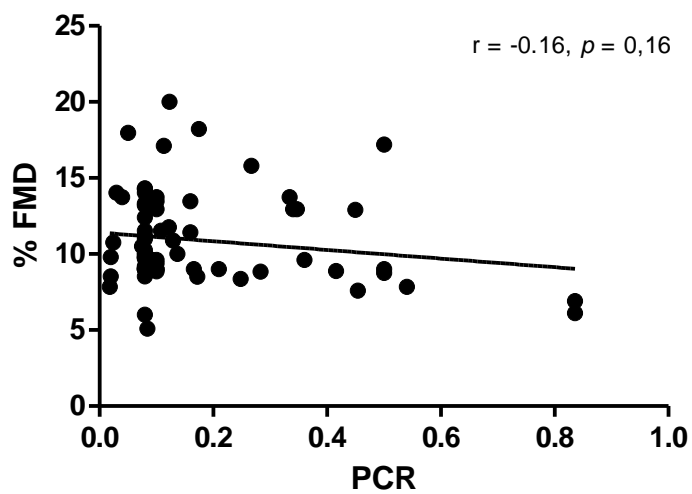


Figura 33 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e PCR-US

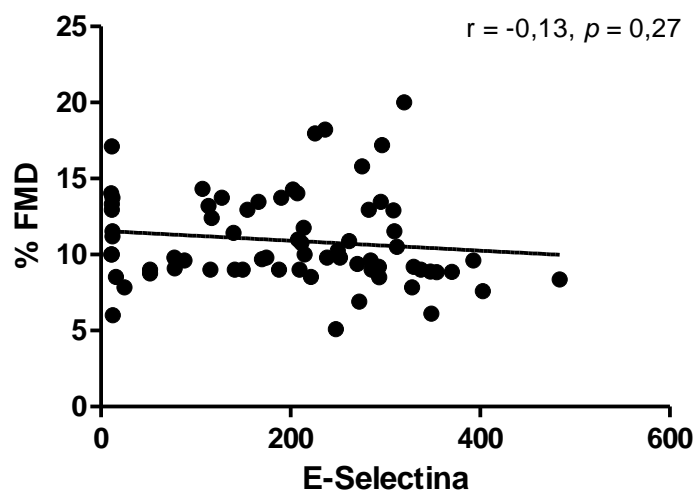


Figura 34 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e sE-selectina

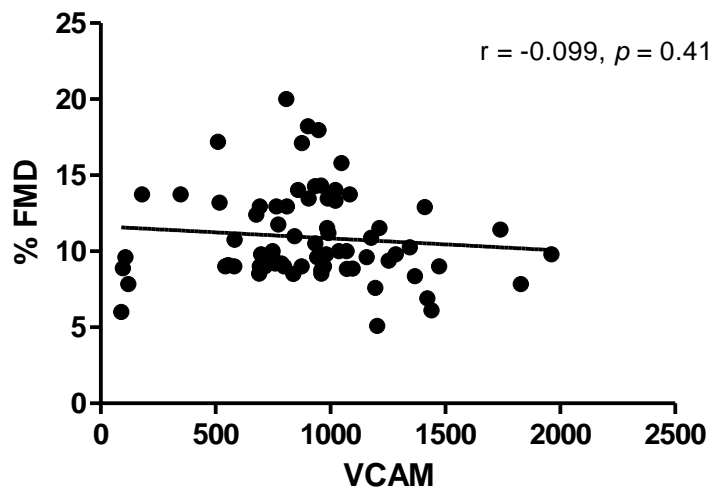


Figura 35 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e VCAM-1

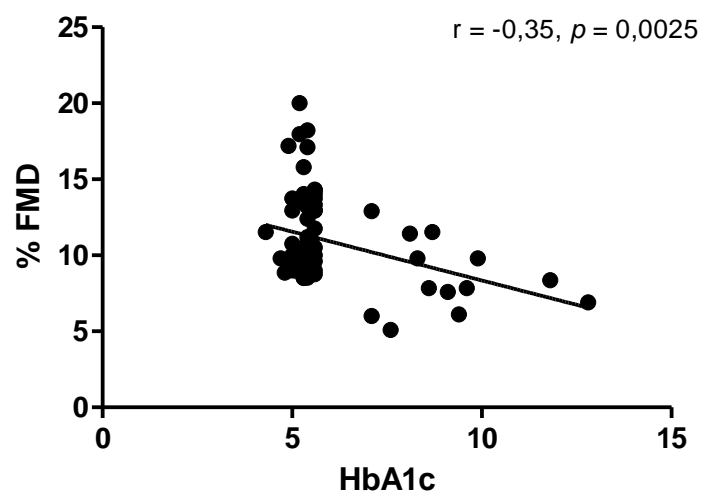


Figura 36 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e HbA1c

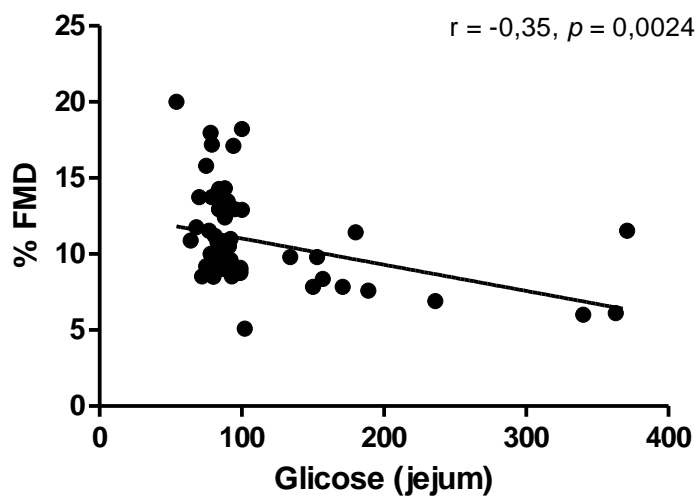


Figura 37 – Correlação linear de Pearson entre %FMD e glicose de jejum

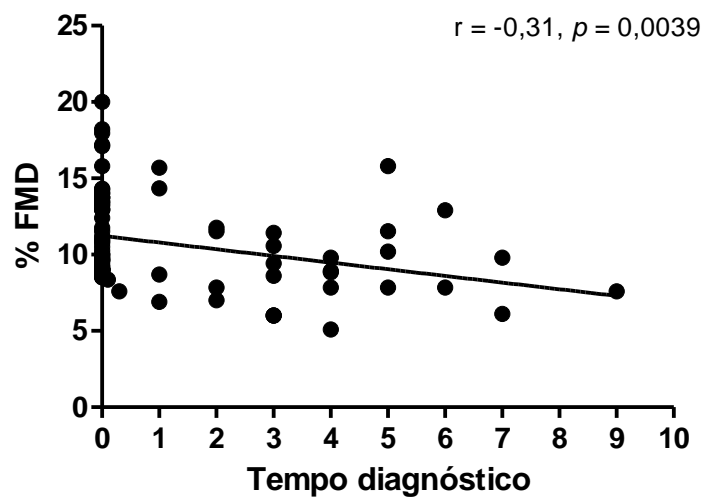


Figura 38 – Correlação linear de Pearson entre % FMD e tempo de diagnóstico

DISCUSSÃO

As doenças macro e microvasculares constituem as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com *Diabetes mellitus*, e a perda do papel modulador do endotélio vascular pode representar seu principal fator desencadeante (DE VRIESE et al., 2000). Reconhecidamente, o DM1 predispõe a doença arterial aterosclerótica prematura e há consistente evidência de que o comprometimento da função endotelial antecede o estabelecimento da mesma (DI CARLI et al., 2003).

As células endoteliais regulam ativamente o tônus e a reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas, respondendo a estímulos mecânicos e mediadores neuro-humorais com a liberação de uma variedade de fatores relaxantes e constritores vasculares, além de sintetizarem substâncias com função reguladora da inflamação e da hemostasia (CALLES-ESACANDON e CIPOLLA, 2001). Como a ação dessas células pode afetar uma ou mais funções, simultaneamente ou em sequência temporal, ainda não está estabelecido um exame padrão-ouro para avaliação de disfunção endotelial (CALLES-ESACANDON e CIPOLLA, 2001). Entretanto, de maneira geral, a função endotelial tem sido estimada por variações no fluxo sanguíneo ou no diâmetro do vaso arterial em resposta a estímulo mecânico ou químico, avaliados de forma invasiva (cateterização coronariana) ou não invasiva (ultrassom), além da mensuração da concentração sanguínea de substâncias químicas que medeiam a função endotelial (CALLES-ESACANDON e CIPOLLA, 2001).

Em nossa população, como já relatado, utilizamos a metodologia ultrassonográfica de FMD da artéria braquial, associada a medidas da IMT da carótida, e correlacionamos os achados com dosagens séricas de: interleucina-6, PCR-US, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1 e MMP-9.

Nossos grupos mostraram-se semelhantes quanto ao gênero, idade, níveis de hemoglobina, hematócrito e perfil lipídico. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas entre o grupo controle e ambos os subgrupos de diabéticos ($DM1 < 5$ e $DM1 \geq 5$), quanto à glicose de jejum e aos níveis de HbA1c, refletindo um controle glicêmico sub-ótimo dos indivíduos diabéticos, independentemente do tempo de diagnóstico. A manutenção do estado hiperglicêmico nestes participantes pode afetar a função endotelial ao alterar os mecanismos moleculares de regulação da síntese de óxido nítrico e/ou sua degradação (BECKMAN et al., 2002) e promover estresse oxidativo, induzindo efeito deletério sobre as células do endotélio (SIEGELAAR et al., 2010) por

meio das quatro vias metabólicas, já descritas na revisão da literatura: a ativação da PKC, a formação de PFGA, a via da hexosamina, e o aumento do fluxo de glicose através da via poli-ol-sorbitol (GIANNINI et al., 2011). Dessa forma, o desequilíbrio entre a produção dos fatores derivados do endotélio, compromete a regulação do tônus vascular e outras propriedades fisiológicas do endotélio (CALLES-ESCANDON e CIPOLLA, 2001), favorecendo um estado de vasoconstrição (DREXLER, 1997) e um estado inflamatório (BECKMAN et al., 2002), perpetuado pela hiperglicemia (KING, 1996). Em nossa população, os resultados da correlação linear de Pearson corroboram essas afirmações ao evidenciar uma correlação entre o comprometimento da resposta vasodilatadora e os níveis séricos elevados de HbA1c e glicose de jejum.

Quanto ao tempo de oclusão utilizado na técnica de FMD da artéria braquial, encontram-se na literatura variações entre 5 e 10 minutos, sendo sugerido como ideal o tempo de 5 minutos por ser mais facilmente tolerado pelos indivíduos (CORRETTI et al., 2002). Entretanto, na realização de nosso estudo, observamos uma intolerância das crianças à permanência do manguito insuflado em 50 mmHg acima da pressão arterial sistólica durante os 5 minutos preconizados. Shivalkar et al, 2006, emprega um tempo de oclusão de 4 min em indivíduos adultos diabéticos tipo 1 e, dada a faixa etária de 6 a 12 anos de nossos participantes, optamos pelo tempo de oclusão de 3 min. Este tempo foi bem tolerado pelas crianças estudadas, e a adaptação no protocolo foi baseada no conhecimento de que o aumento no diâmetro da artéria braquial, após a liberação do manguito, ocorre a partir de um tempo de oclusão de 30s até 5 min, variando pouco entre 5 e 10 min de oclusão (CORRETTI et al., 2002).

Nossos resultados mostraram uma vasodilatação máxima, tanto no grupo controle como nos diabéticos, no 3º min após o estímulo hiperêmico, sugerindo uma resposta mais tardia em nossa população, pois estudos relatam que o aumento máximo do diâmetro da artéria ocorre aproximadamente 60 segundos após a liberação do manguito pneumático (UEHATA et al., 1997; CORRETTI et al., 1995). Esta resposta tardia pode relacionar-se ao menor tempo de estímulo oclusivo em nossa população. No entanto, apesar dos diferentes resultados, nossos grupos apresentaram semelhanças quanto ao diâmetro basal da artéria braquial, eliminando qualquer viés relacionado ao tamanho da artéria, uma vez que, as artérias com diâmetros maiores apresentam menores percentuais de dilatação máxima e vice-versa (CELERMAJER et al., 1992).

A resposta vasodilatatória significativamente reduzida no DM1 \geq 5, em relação ao controle, com valor médio de %FMD max (7,040%) inferior ao limite mínimo

considerado normal em adultos (8%) (ELTAYEB et al, 2014), e reduzida, mas não de forma significativa, em relação ao controle, no DM1<5 (10,21%), sugere que a presença de disfunção endotelial em crianças com DM1 deva ocorrer somente a partir de 5 anos de instalação da doença, mesmo quando o controle metabólico é insatisfatório nos anos anteriores. Resultados semelhantes são encontrados em estudo em população pediátrica diabética, com idade média de 14 anos e tempo médio de doença de 6 anos, sem complicações vasculares, que também evidencia uma função endotelial diminuída, avaliada por FMD, em relação ao grupo controle (WILTSHIRE et al.,2002).

Quanto às alterações após estímulo hiperêmico nos parâmetros relacionados ao fluxo da artéria braquial, como Índice de Pulsatilidade (PI), Índice de Resistividade (RI), Pico Sistólico (PS), Percentual de aumento máximo no PS, , velocidade do fluxo no final da diástole (ED), pico de velocidade Sistólica/ pico de velocidade no final da Diástole (S/D), , velocidade do fluxo no Final da Diástole (ED), Tempo de Aceleração máxima (TA max), os resultados pouco conclusivos e por vezes paradoxais, principalmente em relação ao PI e RI, podem decorrer de dificuldades técnicas na realização do exame relacionadas à população pediátrica. Talvez por esse motivo não encontremos na literatura trabalhos que abordem os parâmetros de fluxo arterial no exame de FMD em populações pediátricas, impossibilitando uma discussão mais aprofundada.

Ao avaliarmos a espessura médio-intimal da carótida, embora os valores médios encontrados estivessem acima dos valores de referência para a faixa etária de 6-12 anos dos participantes (aproximadamente 0,20-0,52 mm, segundo Muñoz et al, 2013), os resultados semelhantes entre os subgrupos de diabéticos e o controle, não permitem afirmar a presença de alterações estruturais ateroscleróticas em nossa população de diabéticos. Os resultados com médias acima dos valores de referência em todos os grupos, inclusive no controle, podem relacionar-se a limitações na realização das medidas de forma manual, ponto a ponto, com compasso ultrassônico, e não de forma automática pelo próprio equipamento.

Ao compararmos nossos achados de FMD e IMT, com os dados encontrados na literatura, observamos que Singh et al. (2003), em estudo americano, também não encontram diferenças na IMT da carótida entre adolescentes diabéticos e grupo controle, embora a FMD encontrada seja inferior, de forma significativa, no grupo diabético. Estes autores concluem que apesar da disfunção endotelial ocorrer na primeira década de instalação do DM1, o aumento na IMT da carótida parece ocorrer apenas após um tempo consideravelmente maior de exposição ao meio diabético.

Outro estudo realizado em uma população finlandesa com DM1, idade entre 7-14 anos e tempo médio de doença de $4,4 \pm 2,9$ anos, sem complicações microvasculares também evidencia uma resposta similarmente atenuada na técnica de FMD, em crianças diabéticas de ambos os sexos, quando comparadas ao controle, com resultados estatisticamente significativos. No entanto, diferentemente de nosso estudo, o pico de maior resposta vasodilatadora ocorre entre 60 e 90 segundos após o estímulo oclusivo e, o subgrupo com disfunção endotelial apresenta valores significativamente maiores de IMT da carótida que o subgrupo sem disfunção endotelial e o grupo controle, não sendo observadas diferenças significantes quanto ao diâmetro basal da artéria braquial, índices antropométricos, tempo de doença ou níveis de HbA1c, entre os grupos diabéticos com e sem disfunção endotelial (JÄRVISALO et al., 2004).

Estudo mais recente realizado no Egito por Eltayeb et al. (2014), avalia a função endotelial e alterações miocárdicas em população pediátrica com DM1, com idade entre 5-16 anos, sem complicações microvasculares e tempo de doença entre 1-4 anos. Estes autores também relatam achados de pico de FMD significativamente menores e de IMT da carótida significativamente maiores no grupo de diabéticos, em comparação com o grupo controle. Além disso, evidenciam níveis séricos significativamente mais elevados de PCR-US, intervalos QT corrigidos mais prolongados (aumento no tempo total de despolarização e repolarização ventricular, corrigido para a frequência cardíaca), assim como um significativo comprometimento da função diastólica do ventrículo esquerdo, com função sistólica preservada, em indivíduos com menos de 4 anos de doença, contradizendo estudo anterior que relaciona a disfunção diastólica do ventrículo esquerdo ao tempo de diagnóstico de DM1 superior a 4 anos (FROM et al. (2009). De forma semelhante, estudo na Turquia, realizado por Ciftel et al., 2014, com diabéticos tipo 1 entre 7-16 anos, com pelo menos 5 anos de diagnóstico, sem complicações diabéticas microvasculares ou riscos cardiovasculares adicionais, também mostra uma menor FMD e maior IMT da carótida em indivíduos diabéticos, em relação ao controle, achados estes também correlacionados com disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, sem comprometimento da função sistólica.

Os diferentes resultados entre os estudos podem decorrer de variados níveis de controle metabólico entre as populações estudadas e, em parte, da utilização de diferentes protocolos para a técnica de IMT da carótida, diferentes métodos para a realização das medidas (manual ou automático), além de sistemas de ultrassom com variados níveis de resolatividade.

Recente estudo longitudinal italiano de Bruzzi et al.(2014), demonstra por meio de avaliação da FMD, após seguimento médio de 3 anos, que a função endotelial de crianças e adolescentes entre 5-18 anos, com DM1 e com tempo de diagnóstico médio de 4 anos, deteriora severamente, sendo o gênero masculino considerado um preditor negativo de comprometimento da FMD no decorrer do tempo. Segundo os autores, a duração da doença deveria representar um importante fator na deterioração da FMD, tanto em adultos quanto em adolescentes, no entanto, nesse estudo, o tempo de diagnóstico é relativamente curto para todos os indivíduos envolvidos. Relatam, ainda, que o controle dos níveis glicêmicos próximo do adequado não parece proteger os diabéticos da evolução da vasculopatia, sugerindo a influência de fatores intrínsecos (genéticos) e extrínsecos (fatores nutricionais, sedentarismo) no estabelecimento do dano endotelial.

Em geral, participantes femininos apresentam uma atividade vasomotora mediada pelo endotélio maior que os participantes masculinos e, entre as várias hipóteses estão: a menor superfície corporal, menor índice de massa corporal e menor diâmetro basal da artéria braquial, em relação ao gênero masculino. Além disso, o estrógeno, apresenta papel positivo na função endotelial, nos participantes em idade puberal e adulta (MIZIA-STECH et al., 2007). Nossa população pré-púbere praticamente não apresentou diferenças entre os gêneros na resposta vasodilatadora, provavelmente pelos diâmetros de artéria braquial basal semelhantes entre os grupos e pela ausência da ação hormonal iniciada com a puberdade. No entanto, em nosso estudo, observou-se uma correlação entre o comprometimento da resposta vasodilatatória na FMD e o tempo de diagnóstico de DM1.

Com relação aos exames laboratoriais, os níveis séricos de PCR-US levemente acima dos valores de referência no subgrupo $DM1 \geq 5$, superiores de forma estatisticamente significante em relação ao controle, sugerem a presença de um estado inflamatório sistêmico de baixa intensidade em nossa população diabética com maior tempo de diagnóstico.

O *The Search Case-Control Study*, que avalia diabéticos tipo 1 com idade entre 10-22 anos, relata níveis séricos de IL-6, PCR-US e fibrinogênio significativamente maiores nos indivíduos diabéticos com peso adequado para a idade, em relação aos controles. No caso da IL-6 e do fibrinogênio, de forma independente dos níveis de HbA1c. No entanto, a PCR-US apresenta níveis significativamente maiores apenas nos grupos com níveis de HbA1c nos três quartis mais elevados (SNELL-BERGEON et al., 2010). Considerando nosso estudo, o subgrupo $DM1 \geq 5$, com níveis de PCR-US significativamente elevados em relação ao controle, apresentou os níveis de HbA1c mais

elevados (9.57%, $p = 0.018$), superiores aos do subgrupo DM1<5 (8.83%, $p = 0.015$), e superiores aos níveis do grupo controle, com significância estatística, corroborando os achados de Snell-Bergeon et al., 2010.

A hiperglicemia aguda e um pior controle glicêmico no curso inicial do DM1 tem sido associado com um aumento da inflamação em crianças diabéticas, mas esta associação está menos clara na hiperglicemia crônica entre crianças com maior tempo da doença (SNELL-BERGEON et al., 2010). Em estudo com 22 crianças com DM1 a hiperglicemia aguda mostra-se associada a aumentos nos níveis de IL-6, IL-4, IL-1 α e o aumento na inflamação persiste por pelo menos 2h após a correção da hiperglicemia (ROSA et al., 2008). Em nossa população, o subgrupo DM1<5 revelou o maior nível médio de glicose de jejum entre os grupos, e uma leve tendência a níveis superiores de IL-6 em relação ao controle e ao DM1 \geq 5, embora dentro do intervalo de referência, sem diferenças estatisticamente significantes, não permitindo afirmar a presença de um estado inflamatório naquele subgrupo.

Na literatura, a elevação nos níveis séricos da IL-6 e PCR-US tem sido associada ao desenvolvimento subsequente de aterosclerose (LIBBY et al, 20012). Entretanto, para fins de aplicação clínica, o marcador inflamatório mais promissor parece ser a PCR-US, (PEPYS, 1981) pois, em comparação com a IL-6 que induz sua produção hepática, apresenta um meia-vida mais longa, com níveis séricos mais estáveis, sem variação circadiana dos mesmos (MEIER-EWERT et al., 2001), o que talvez possa explicar em nosso estudo, a elevação dos níveis séricos de PCR, não acompanhada da elevação dos níveis de IL-6, no subgrupo DM1 \geq 5.

Segundo Verma et al. (2002), a PCR induz a liberação de ET-1, IL-6 e moléculas de adesão (E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1) pelas células endoteliais, diminuindo a síntese de NO e inibindo a síntese da eNOS, além de facilitar a captação de LDL pelo macrófago, apresentando papel não só no desenvolvimento de disfunção endotelial, mas do processo de aterosclerose.

As moléculas de adesão celular medeiam a chegada de grande quantidade de leucócitos (selectinas) e sua adesão (VCAM-1 e ICAM-1) ao endotélio, no entanto, embora reflitam um estado inflamatório generalizado, investigações adicionais são necessárias para determinar seu papel no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (BARAC et al., 2007).

Curiosamente, em nosso estudo, os níveis séricos de sE-Selectina foram encontrados acima dos valores de referência no grupo controle e podem ser justificados

por variações biológicas aceitáveis quando testes de aplicabilidade em pesquisa clínica, e não em rotina laboratorial, são utilizados. Já os níveis séricos de E-selectina acima dos valores de referência nos dois subgrupos diabéticos, de forma estatisticamente significativa no DM1 \geq 5, em relação ao controle, somados aos níveis de sVCAM-1 acima dos valores de referência, e significativamente elevados em ambos os subgrupos diabéticos, em relação ao controle, sugerem a presença de disfunção endotelial em nossa população diabética, principalmente naqueles com maior tempo de diagnóstico. No entanto, apesar dos resultados laboratoriais estatisticamente significativos, os níveis séricos de PCR-US, sE-selectina e sVCAM-1 não apresentaram correlação com a resposta vasodilatadora no teste de Pearson.

A maioria dos dados da literatura sobre marcadores de disfunção endotelial vêm de estudos em pacientes adultos com DM2. Os dados em pacientes com DM1, especialmente crianças são escassos e inconsistentes. *O EURODIAB Prospective Complications Study* em adultos com DM1 revela concentrações significativamente elevadas de sVCAM-1, sE-selectina, PCR-US, IL-6 e TNF- α em diabéticos com complicações crônicas, comparados àqueles sem complicações (SCHRAN et al., 2003). Outro estudo longitudinal dinamarquês, em adultos com DM1 demonstra concentrações significativamente maiores de sICAM-1, sVCAM-1, IL-6 e PAI-1 em pacientes que morreram durante os 10 anos de seguimento (ASTRUP et al., 2008).

Dogruel et al. (2001), observam em crianças com DM1, sem complicações vasculares, níveis significativamente elevados de E-selectina, sem diferenças significativas dos níveis de VCAM-1 e ICAM-1, em relação ao controle. Por outro lado, em população semelhante com 30 diabéticos tipo 1, sem complicações microvasculares, Velarde et al, 2010, encontram, como em nosso estudo, níveis significativamente elevados de sE-selectina e VCAM-1, em relação ao controle.

Em estudo polonês com 123 crianças e adolescentes com fatores de risco cardiovasculares, entre os quais 51 diabéticos tipo 1, Glowinska et al, 2005, relatam concentrações significativamente elevadas de sICAM-1, sVCAM-1, assim como sE-selectina no grupo de estudo. Mais recentemente, estudo polonês de Machnica et al, 2014, com crianças e adolescentes entre 8-18 anos e tempo de diagnóstico de pelo menos 3 anos para crianças pré-púberes e, pelo menos 2 anos para adolescentes, com média de HbA1c relativamente satisfatória (7,17%), evidencia concentrações significativamente superiores de sVCAM-1, TNF- α e IL-6 no grupo de diabéticos e de sE-selectina no grupo controle.

As diferenças observadas entre os vários estudos podem ser justificadas pela potencial influência de estímulos sobre as moléculas de adesão ainda pouco conhecidos e, por este motivo, difíceis de controlar. Além do que, muitos dos dados disponíveis vêm de grupos relativamente pequenos, o que poderia adicionalmente comprometer os resultados. Devendo-se considerar, ainda, os variados níveis de controle metabólico do DM1 (níveis de HbA1c) entre os participantes dos estudos como fator confundidor.

Jude et al., 2002, em estudo prospectivo com 5 anos de seguimento, em população adulta, associam os níveis elevados de ICAM-1 a um maior risco de desenvolvimento de doença cardiovascular no DM1, não sendo observada a mesma associação com níveis elevados de VCAM-1, P-selectina e E-selectina. Em nossa população de diabéticos, os níveis séricos normais de sICAM-1 parecem indicar um baixo risco de desenvolvimento de doenças macrovasculares em curto prazo, corroborado pelos resultados das medidas de IMT das carótidas ao ultrassom que sugerem a ausência de lesões estruturais iniciais de aterosclerose.

Além disso, os níveis séricos de MMP-9 mostraram-se dentro dos valores de referência em todos os grupos, sem diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos. Como relatado anteriormente, as metaloproteinases matriciais, MMP-2 e MMP-9 são responsáveis pela destruição da matriz extracelular, digerindo gelatinas (colágeno desnaturado), fibronectina, elastina e laminina, favorecendo o remodelamento vascular no processo aterosclerótico (BORDEN e HELLER, 1997). O meio hiperglicêmico induz um aumento de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 (ANDERSON et al., 1996), e seus níveis estão de acordo com o estágio do diabetes e a severidade das complicações (VERA et al, 2002). As MMP-2 são sintetizadas pelas células endoteliais, entretanto, como as MMP-9 são predominantemente secretadas por macrófagos e um aumento na sua concentração pode ser esperado com o desenvolvimento de complicações vasculares em indivíduos diabéticos (ALISON et al., 2003).

Lee et al. (2005), em estudo com adultos diabéticos tipo 2, com no máximo 3 anos de diagnóstico, sem complicações vasculares, não evidenciam em sua população elevação dos níveis séricos de MMP-9, mas sim de MMP-2. No entanto, estudo de Symeonidis et al. (2013), em crianças diabéticas tipo 1, entre 5 e 15 anos, mostra um significativo aumento da MMP-9 e MMP-2, em amostras lacrimais, sem correlações significantes com o tempo de doença ou com os níveis séricos de HbA1c. Estes autores sugerem que seus achados podem indicar um processo inflamatório relativamente agudo ativo no sistema

lacrimar dos pacientes pediátricos, com progressão da doença microvascular (retinopatia diabética), assim como um remodelamento patológico localizado.

Em estudo de Thrailkill et al. 2010, com indivíduos diabéticos tipo 1, com idade entre 4 e 40 anos e controle glicêmico sub-ótimo (HbA1c $8,3 \pm 1,8\%$), as concentrações plasmáticas de MMP-9 não apresentam diferenças em relação ao controle, mas estão significativamente elevadas na urina. Segundo os autores, seu estudo demonstra que a excreção urinária de MMP-9 está positivamente correlacionada com os níveis de HbA1c e com o tempo de doença, sugerindo que sua mensuração pode funcionar como um marcador de nefropatia latente, antecedendo a microalbuminúria definida clinicamente.

A monitorização de MMP-9 parece ter utilidade como marcador preditivo de complicações microvasculares do DM1, e a ausência dessas complicações, bem como de complicações macrovasculares ateroscleróticas em nossa população pode justificar os valores normais encontrados em nosso estudo.

Este estudo tem relevância por avaliar a presença de disfunção endotelial e alterações estruturais iniciais de aterosclerose em crianças diabéticas tipo 1, com faixa etária pré-escolar a pré-puberal e tempos de diagnósticos de 1 mês a 9 anos, por meio de métodos ultrassonográficos e dosagem de três tipos de biomarcadores: de inflamação, disfunção endotelial e injúria vascular. Existem outros estudos na literatura que fazem o mesmo, no entanto, de forma menos abrangente.

As limitações do estudo estão relacionadas ao tamanho pequeno da população do grupo de diabéticos ($n=31$); critérios de exclusão mais liberais para os valores de colesterol total ($\geq 200\text{mg/dL}$) e LDL ($\geq 130\text{mg/dL}$), em relação aos preconizados para a população pediátrica ($\geq 150\text{mg/dL}$ e $\geq 100\text{mg/dL}$, respectivamente), podendo a leve dislipidemia representar fator confundidor no processo de disfunção endotelial pelo DM1; tempo de 3 min para a oclusão da artéria braquial que pode não ter permitido a dilatação máxima potencial da mesma; limitações técnicas em relação à técnica de IMT (medidas manuais); e a realização dos exames ultrassonográficos por um único examinador, sem uma avaliação da variabilidade entre observadores independentes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, nosso estudo sugere que crianças diabéticas com 5 ou mais anos de diagnóstico podem apresentar disfunção endotelial e um estado inflamatório sistêmico de baixa intensidade, embora sem alterações estruturais de aterosclerose, estando a diminuição da resposta vasodilatadora correlacionada ao tempo de diagnóstico e aos níveis séricos de HbA1c e glicose de jejum. Os achados não são tranquilizadores, posto que a disfunção endotelial constitui o passo inicial para o desenvolvimento de doença macrovascular aterosclerótica com suas complicações cardiovascular, cerebrovascular e vascular periférica na vida adulta que manifestam-se de forma precoce na população diabética, em relação à população geral.

Como a reatividade da artéria braquial parece melhorar com a modificação de fatores de risco e o tratamento com drogas que reduzem o risco cardiovascular, o conhecimento da ocorrência de disfunção endotelial em diabéticos na faixa etária pediátrica estimula a busca e adoção de estratégias que possam prevenir e atenuar o processo nesta população, contribuindo, assim, para a redução do impacto do *Diabetes mellitus* tipo 1 na morbi-mortalidade na vida adulta.

Estudos adicionais são necessários para determinar se a avaliação da função endotelial por FMD e dosagem laboratorial de provas inflamatórias e moléculas de adesão constituem ferramentas clinicamente úteis para a estratificação do risco cardiovascular em crianças diabéticas tipo 1, em termos individuais e populacionais, bem como se uma melhora na função endotelial diminuiria o risco de desenvolvimento de complicações vasculares ateroscleróticas nestes indivíduos ao longo do curso da doença.

8. REFERÊNCIAS

Alison KD, Elizabeth JE, Kristine CYM, Dennis KY. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis*. 2003; 168: 263-269.

American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes. *Diabetes Care*. 2014a; 37 (Suppl. 1): S81–S90.

American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes – 2014. *Diabetes Care*. 2014b; 37 (Suppl. 1): S14–S80.

Anderson SS, Wu K, Nagase H, et al. Effect of matrix glycation on expression of type IV collagen, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 by human mesangial cells. *Cell Adhes Commun*. 1996; 4: 89-101.

Assert R, Scherk G, Bumbure A, et al. Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro. *Diabetologia*. 2001; 44: 188–195.

Astrup AS, Tarnow L, Pietraszek L, et al. Markers of endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetic patients with or without diabetic nephropathy followed for 10 years: association with mortality and decline of glomerular filtration rate. *Diabetes Care*. 2008; 31: 1170-1176.

Avaliação da IMT da carótida por ultrassom. Disponível em: <<http://www.sononet.us/exams/wellexams/imtphysican.htm>>. Acesso em 2 out 2014.

Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res*. 2009; 335: 165-189.

Barac A, Campia U e Panza JA. Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension*. 2007; 49: 748-760.

Beaudeux JL, Giral P, Brukert E. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects. *Ann Biol Clin*. 2003; 61: 147-158.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002; 287: 2570-2581.

Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, et al. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*. 2001; 103: 1618-1623.

Biegelsen ES, Loscalzo J. Endothelial function and atherosclerosis. *Coron Artery Dis*. 1999; 10: 241-256.

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, et al. Advanced glycation end products (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation*. 1997; 96: 2262-2271.

Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med*. 2002; 252: 283-294.

Borden P, Heller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Euk Gene Exp*. 1997; 7: 159-178.

Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Increased common carotid intima-media thickness. Adaptive response or a reflection of atherosclerosis? Findings from the Rotterdam Study. *Stroke*. 1997, Dec; 28 (12): 2442-2447.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature*. 2001; 414: 813-821.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1615-1625.

Bruzzi P, Predieri B, Patianna VD, et al. Longitudinal evaluation of endothelial function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: A long-term follow-up study. *Pediatrics International*. 2014; 56: 188–195.

Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 1991; 87: 432-438.

Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev.* 2001 Feb; 22 (1): 36-52.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 340: 1111–1115.

Ceriello A, Giacomello R, Stel G, et al. Hyperglycemia-induced thrombin formation in diabetes: the possible role of oxidative stress. *Diabetes.* 1995; 44: 924–928.

Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, et al. Evidence for a hyperglycaemia-dependent decrease of antithrombin III–thrombin complex formation in humans. *Diabetologia.* 1990; 33: 163–167.

Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fahri N, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med.* 2003; 198: 1507-1515.

Çiftel M, Ertug H, Parlak M, et al. Investigation of endothelial dysfunction and arterial stiffness in children with type 1 diabetes mellitus and the association with diastolic dysfunction. *Diabetes & Vascular Disease Research.* 2014; Vol 11 (1): 19 –25.

Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density protein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 28: 573-579.

Coleman JW; Nitric oxide in immunity and inflammation. *Rev. International Immunopharmacology.* 2001; vol.1: 1397- 1406.

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39 (2): 257-265.

Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol* 1995; 268: H1397–H1404.

Costacou T, Lopes-Virella MF, Zgibor JC, et al. Markers of endothelial dysfunction in the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. *The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications*. 2005; 19: 183-193.

Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, et al. High glucose increases nitric oxide synthase expression and NO generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1997; 96: 25-28.

Cowan DB, Langille BL. Cellular and molecular biology of vascular remodeling. *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7: 94–100.

Creager MA, Lüscher TF, et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences and medical therapy: part 1. *Circulation*. 2003; 108: 1527-1532.

Cummings MH, Watts GF, Umpleby AM, et al. Increased hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetologia*. 1995; 38: 959–967.

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011; 378(9785):31–40.

Dawson S, Henney A. The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis*. 1992; 95: 105-117.

DCCT Research Group. The effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus: The Diabetic Control and Complications Trial. *N Engl J Med.* 1993; 329: 978-986.

De Man FH, Weverling-Rijnsburger AW, van der Laarse A, et al. Not acute but chronic hypertriglyceridemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation: reversal after lipid-lowering therapy by atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 744–750.

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, et al. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000; 130: 963-974.

Di Carli MF, Janisse J, Grunberger G, et al. Role of chronic hyperglycemia in the pathogenesis of coronary microvascular dysfunction in diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41 (8): 1387-1393.

Dimitriadis E, Griffin M, Owens D, et al. Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relationship to fatty acid composition. *Diabetologia.* 1995; 38: 1300–1306.

Dogruel N, Kirel B, Akgün Y, et al. Serum soluble endothelial-cell specific adhesion molecules in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001; 14: 287-293.

Donaghue KC, Chiarelli F, Trotta D, Allgrove J, Dahl-Jorgensen K. Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes.* 2009; 10 (Suppl. 12): 195–203.

Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997; 39: 287-324.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 12222-12226.

Du X, Matsumura T, Edelstein D, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1049-1057.

Egan BM, Lu G, Greene EL. Vascular effects of non-esterified fatty acids: implications for the cardiovascular risk factor cluster. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 60: 411-420.

Eltayeb AA, Ahmad FA, Sayed DM, Osama AM. Subclinical vascular endothelial dysfunction and myocardial changes with type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. *Pediatr Cardiol*. 2014; 35:965–974.

Esposito C, Gerlach H, Brett J, et al. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med*. 1989; 170: 1387-1407.

From AM, Scott CG, Chen HH. Changes in diastolic dysfunction in diabetes mellitus overtime. *Am J Cardiol*. 2009; 103: 1246–1463.

Fukumoto H, Naito Z, Asano G, et al. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 1998; 5: 29–35.

Gabriely I, Yang XM, Cases JA, et al. Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281: R795-R802.

Gao Z, Zhang X, Zuberi A, et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2004; 18: 2024-2034.

Giannini C, Mohn A, Chiarelli F, Kelnar CJH. Macrovascular angiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011; 27: 436-460.

Giannini C, Mohn A, Chiarelli F. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009; 25 (Suppl. 1): S34-S44.

Gimbrone MA Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 722-726.

Giménez M, Gilabert R, Lara M, Conget I. Preclinical arterial disease in patients with type 1 diabetes without other major cardiovascular risk factors or micro-/macrovascular disease. *Diabetes and Vascular Disease Research.* 2011; 8 (1): 5-11.

Global IDF/ISPAD Guideline for Diabetes in Childhood and Adolescence. International Diabetes Federation, ISBN 2-930229-72-1. 2011.

Glowinska B, Urban M, Peczynska J, et al. 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: 1020-1026.

Goldberg RB. Cytokine and cytokine like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 3171-3182.

Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Moll Cell.* 1998; 2: 275-281.

Gustafsson M, Boren J. Mechanism of lipoprotein retention by extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15: 505-514.

Hafer-Macko CE, Ivey FM, Gyure KA, et al. Thrombomodulin deficiency in human diabetic nerve microvasculature. *Diabetes.* 2002; 51: 1957-1963.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2153-2157.

Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007; 446: 1017-1022.

Hashimoto M, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995; 92: 3431–5.

Hattori Y, Hattori S, Sato N, et al. High-glucose-induced nuclear factor kappa B activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2000; 46: 188–197.

Hirase T, Node K. Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302: H499-H505.

Hopfner RL, Gopalakrishnan V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia*. 1999; 42: 1383-1394.

Hurks R, Eisinger MJ, Goovaerts I, et al. Early dysfunction in young type 1 diabetics. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009; 37: 611-615.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, 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: 1939-1945.

ISPAD (International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes) Clinical Practice Consensus Guidelines 2014 Compendium. *Pediatric Diabetes*. 2014; 15 (Suppl. 20): 4–17.

Järvisalo MJ, Jartti L, Näntö-Salonen K, et al. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation*. 2001; 104: 2943–2947.

Järvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*. 2004; 109: 1750-1755.

Järvisalo MJ, Rönnemaa T, Volanen I, et al. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: H87-H92.

Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993; 27: 567-574.

Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, et al. Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in diabetic retina. *Am J Pathol*. 2001; 158: 147-152.

Jude EB, Douglas JT, Anderson SG, et al. Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. 2002; 13: 185-189.

Kaise N, Sasson S, Fener EP et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth cells. *Diabetes*. 1993; 42: 80-89.

Kario K, Matsuo T, Kobayashi H, et al. Activation of tissue factor-induced coagulation and endothelial cell dysfunction in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15: 1114–1120.

Kim F, Tysseling KA, Rice J, et al. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by I κ B β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 989-994.

King GL. The role of hyperglycaemia and hyperinsulinemia in causing vascular dysfunction in diabetes. *Ann Med*. 1996; 28: 427-432.

King H, Aubert RE, HermanWH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998; 21: 1414-1431.

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47: 859-866.

Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, et al. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile onset insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 1987; 59: 750-5.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 4651-4655.

Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, et al. Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol.* 1991; 68:1425–1430.

Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD et al. Mortality from heart disease in cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia.* 2003; 46: 760-765.

Lee SW, Song KE, Shin DS, et al. Alterations in peripheral blood levels of TIMP-1, MMP-2, and MMP-9 in patients with type-2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 69: 175-179.

Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995; 91: 2844-2850.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105: 1135-1143.

Lind L, Sanne AEP, Hester M, et al. Effect of rosuvastatin on the echolucency of the common carotid intima-media in low risk individuals: The METEOR Trial. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012; 25: 1120-1127.

Lin KY, Ito A, Asagami T, et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.* 2002; 106: 987-992.

Li Y, Woo V, Bose R. Platelet hyperactivity and abnormal Ca(2+) homeostasis in diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: H1480–H1489.

- Machnica L, Deja G, Polanska J, Jarosz-Chobot P. Blood pressure disturbances and endothelial dysfunction markers in children and adolescents with type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2014; 237: 129-134.
- Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *Faseb J*. 1992; 6: 2591-2599.
- Marieb EN, Hoehn K. *Anatomy and physiology*. Pearson Education, Inc., 3^a edição, 2007. p. 626.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006; 3 (11): e442.
- Matsuoka H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001; 54 (suppl). 2: S65-S72.
- McDaid EA, Monaghan B, Parker AI, et al. Peripheral autonomic impairment in patients newly diagnosed with type II diabetes. *Diabetes Care*. 1994; 17: 1422–1427.
- McGill HC Jr. The pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Chem*. 1998; 34: B33-B39.
- McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE et al. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72: 1307S-1315S.
- Mizia-Stec K, Zbigniew G, Mizia M et al. Flow-mediated dilation and gender in patients with coronary artery disease: arterial size influences gender differences in flow-mediated dilation. *Echocardiography*. 2007; 24: 1051–7.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
- Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, et al. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem*. 2001; 47: 426-430

Muñoz A A, Cajal M M D, Aizpun J I L, et al. Índice íntima-media carotídeo; valores de normalidad desde los 4 años. *Nutr Hosp.* 2013; 28 (3):1171-1176.

Murphy G, Willenbrock F, Crabble T, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 732: 31-41.

Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al., Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 842-851.

Nathan C, Xie Q-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell.* 1994; 78: 915–8.

Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1676-1685.

Nickenig G, Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation.* 2002; 105: 393-396.

Nicolau LGC, Martins WP, Ferreira AC, et al. Avaliação da dilatação máxima da artéria braquial em gestantes e não gestantes, fumantes e não fumantes. *Radiol Bras.* 2010 Mar/Abr; 43 (2): 85–89.

O'Driscoll G, Gree D, Rankin J, et al. Improvement in endothelial function by angiotensin converting enzyme inhibition in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1997; 100: 678-684.

O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Cardiovascular health study collaborative research group. Carotid artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. *N Engl J Med.* 1999; 340: 14-22.

Pambianco G, Costacou T, Ellis D et al. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes.* 2006; 55: 1463-1469.

Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1378-1382.

Pepys MB. C-reactive protein fifty years on. *Lancet.* 1981; 1: 653-657.

Peters SAE, den Ruijter HM, Bots ML. Ultrasound protocols to measure carotid intima-media thickness: one size does not fit all. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012; 25 (10): 1135-1139.

Pieper GM, Meier DA, Hager SR. Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol.* 1995; 269: H845-H850.

Polak JF. Measuring carotid intima-media thickness: simple protocols have advantages. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012; 25 (10): 1131-1134.

Polak JF, Pencina MJ. Measuring carotid artery intima-media thickness: simplicity versus complexity? *J Am Soc Echocardiogr.* 2012; 25: 101-104.

Pollanen JP, Karhunen PJ, Mikkelsen J. Coronary artery complicated lesion area is related to function polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1446-1450.

Potashnik R, Bloch-Damti A, Bashan N, Rudich A. IRS1 degradation and increased serine phosphorylation cannot predict the degree of metabolic insulin resistance induced by oxidative stress. *Diabetologia.* 2003; 46: 639-648.

Protocol for the Study of the Intima-Media Thickness (IMT) and Platelets in the Carotid Artery. Preoperative Workshop 2012. Villa Giardino, Córdoba, Argentina. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2012; 41(4): 308-312.

Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev.* 1987; 3: 463-524.

Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetroic mice. *Am J Pathol.* 1997; 150: 1687-1699.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 148: 1482-1489.

Ren S, Lee H, Hu L, et al. Impact of diabetes-associated lipoproteins on generation of fibrinolytic regulators from vascular endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 286-291.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, et al. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000; 101: 1767-1772.

Rogowicz A, Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Role of matrix metalloproteinases in the development of vascular complications of diabetes mellitus – clinical implications. *Pol Arch Med Wewn.* 2007; 117 (3): 1-5.

Rojas A, Romay S, Gonzalez D et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end product. *Circ Res,* 2000; 86: E50-E54.

Rosa JS, Oliver SR, Pontello AM, et al. Sustained IL-1 α , IL-4 and IL-6 elevations following correction of hyperglycemia in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes.* 2008; 9: 9-16.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126.

Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* 1996; 127: 263-271.

Schmidt AM, Hasu M, Popov D, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 8807-8811.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetes vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999; 84: 489-497.

Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, et al. EURODIAB Prospective Complications Study Group, vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetes Care*. 2003; 26: 2165-2173.

Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, et al. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes – the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2005; 48: 370-378.

Sheetz MJ, King GI. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002; 288: 2579-2588.

Shivalkar B, Dhondt D et al. Flow mediated dilatation and cardiac function in type 1 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2006 Jan 1; 97 (1): 77-82.

Siegelaar SE, Holleman F, Hoekstra JBL e DeVries JH. Glucose variability; does it matter? *Endocrine Reviews*. 2010 April; 31 (2): 171-182.

Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41 (4): 661-665.

Síntese e efeitos biológicos do óxido nítrico. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000300002>. Acesso em 10 set 2014.

Snell-Bergeon JK, West NA, Mayer-Davis EJ, et al. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun; 95 (6): 2868-2876.

Sniderman AD, Scantlebury T, Cianflone K. Hypertriglyceridemic hyperapob: the unappreciated dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2001; 135: 447-459.

Sniderman A, Thomas D, Marpole D, et al. Low density lipoprotein: a metabolic pathway for return of cholesterol to the splanchnic bed. *J Clin Invest.* 1978; 61: 867-873.

Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014, disponível em: <[http:// www.diabetes.org.br](http://www.diabetes.org.br)>, acesso em 31/09/2014).

Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Schalkwijk CG *et al.* Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectina are associated with micro and macrovascular complications in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2006; 20: 188-195.

Soltész G, Patterson CC, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence - what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes.* 2007; 8 (Suppl 6): 6-14.

Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74: 247-53.

Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res.* 1997; 34: 55-68.

Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, et al. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes.* 2000; 49: 1231-1238.

Suzuki LA, Poot M, Gerrity RG, et al. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth- promoting effects of high glucose levels. *Diabetes.* 2001; 50: 851-860.

Symeonidis C, Papakonstantinou E, Galli A, et al. Matrix metalloproteinase (MMP-2, -9) and tissue inhibitor (TIMP-1, -2) activity in tear samples of pediatric type 1 diabetic patients. 2013; 251: 741-749.

Szmitko PE, Wang C, Weisel RD et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. Circulation. 2003; 108: 1917-1923.

Taylor PD, Poston L. The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. Br J Pharmacol. 1994; 113: 801-808.

Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, et al. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. J Clin Invest. 1990; 85: 929-932.

Thraill KM, Moreau CS, Cockrell GE, et al. Disease and gender-specific dysregulation of NGAL and MMP-9 in type 1 diabetes mellitus. 2010; 37: 336-343.

Timimi FK, Ting HH, Haley EA, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Am Coll Cardiol. 1998; 31: 552-557.

Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects, Diabetes. 2003; 52: 2882-2887.

Toft I, Bona KH, Ingebretsen OC, et al. Fibrinolytic function after dietary supplementation with omega3 polyunsaturated fatty acids. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; 17: 814-819.

Tonstad S, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, et al. Risk factors related to carotid intima-media thickness and plaque in children with familial hypercholesterolemia and control subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996; 16: 984-991.

Uehata A, Lieberman EH, Gerhard MD, et al. Noninvasive assessment of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery. Vasc Med. 1997; 2: 87-92.

Uemura S, Matsushita H, Li W, et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res*. 2001; 88: 1291–1298.

Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990; 323: 27-36.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 9220-9225.

Velarde MS, Carrizo DR, Prado MM, et al. Inflammation markers and endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes. *Medicina (B. Aires)*. 2010; 70: 44-48.

Vera PD, Anstadt J, Hutchinson M, Bannan M, et al. Evidence for matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 3063-3068.

Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*. 2002b; 105: 1890-1896.

Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002a; 106: 913-919. Via do polioli-sorbitol Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyol_pathway>. Acesso em 10 set 2014.

Vinik AI, Erbas T, Park TS, et al. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24: 1476-1485.

Vraners D, Cooper ME, Dilley RJ, et al. Cellular mechanism of diabetic vascular hypertrophy. *Microvasc Res*. 1999; 57: 8-18.

Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998; 273: 25804-25808.

Wautier MP, Chappey O, Corda S, et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280: E685-E694.

Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* 2003; 107: 1783–1790.

Wang XL, Zhang L, Youker K, et al. Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes.* 2006; 55: 2301-2310.

Wiltshire EJ, Gent R, Hirte C, et al. Endothelial dysfunction relates to folate status in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51: 2282-2286.

Widlanski ME, Gokce N, Keaney Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Oct 1; 42 (7): 1149-1160.

Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 551-561.

Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, et al. Acute hyperglycaemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation.* 1998; 97: 1695-1701.

Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul.* 1996; 34: 159–87.

World Health Organization (WHO). Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycaemia: Report of a WHO/IDF Consultation. Geneva, Switzerland, 2006.

World Health Organization (WHO). Global status report on noncommunicable diseases in 2010. Geneva, Switzerland, 2011.

Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG. Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET(A) receptors and platelet activating factor. *Br J Pharmacol.* 1999; 127: 969-979.

9. APÊNDICE

1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA

Laboratório de Pesquisa e Centro de Estudos de Doença Celíaca

Equipe de Pesquisa: aluna de mestrado Antonella Márcia Mercadante de Albuquerque do Nascimento, Profa. Dra. Lenora Gandolfi, Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega, Prof. Dr. Daniel França Vasconcelos, sob a coordenação do Prof. Dr. Riccardo Pratesi

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Venho por meio deste termo de consentimento livre e esclarecido, solicitar sua autorização para a participação do menor sob sua responsabilidade, _____, no projeto de pesquisa intitulado **“Associação de disfunção endotelial com alterações estruturais iniciais de aterosclerose e presença de marcadores séricos sugestivos de inflamação, disfunção endotelial e injúria vascular em crianças portadoras de Diabetes Mellitus tipo1”**. Este projeto tem como objetivo detectar alterações nos vasos sanguíneos que antecedem o estabelecimento do processo de aterosclerose. A aterosclerose leva uma obstrução lenta e gradual dos vasos sanguíneos, determinando, na vida adulta, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose em vasos das pernas, entre outras doenças com elevada taxa de mortalidade em pessoas diabéticas. Daí a importância de verificar-se, o mais cedo possível, o início desse processo para que suas consequências a longo prazo sejam evitadas.

Para participar do estudo serão necessários a retirada de uma amostra de sangue das veias do braço, com mínimo risco para a saúde, como usualmente se realiza nos exames laboratoriais de rotina, e a realização de 2 tipos de exames com aparelho de ultrassom (um no braço e outro no pescoço), sem dor ou desconforto para o participante.

Os testes serão realizados por profissionais experientes, sem nenhum custo financeiro para o participante. Os resultados serão informados oportunamente ao responsável e o nome do menor será mantido em privacidade, sem sua identificação em relatório ou publicação de qualquer natureza. A recusa em participar da pesquisa não implicará em qualquer prejuízo na prestação de assistência pela equipe médica envolvida e, mesmo após a assinatura do termo de consentimento, o participante poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento, também sem prejuízo algum.

Assine este termo se estiver satisfeito e sem dúvidas relacionadas às informações acima.

Em caso de dúvidas, mesmo após a assinatura, as mesmas poderão ser esclarecidas pela principal pesquisadora colaboradora, Antonella de Albuquerque do Nascimento pelo telefone (61)78133888.

Data: / /

Assinatura do responsável pelo menor participante do projeto

Assinatura do medico