

## DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA RESISTÊNCIA À INSULINA E DIABETES MELITO: EFEITOS DO EXERCÍCIO

### ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN INSULIN RESISTANCE AND DIABETES MELLITUS: EFFECTS OF EXERCISE

Carlos Alberto da Silva<sup>1</sup>, Jorge Pinto Ribeiro<sup>2</sup>, Waldomiro Carlos Manfroí<sup>2</sup>

#### RESUMO

Indivíduos com resistência à insulina e diabetes melito têm morbidade e mortalidade cardiovascular aumentada. A disfunção endotelial tem sido implicada na patogênese da doença vascular diabética. Essa função anormal ocorre precocemente, antes da manifestação da doença cardiovascular, caracterizando-se por redução do vasorelaxamento dependente do endotélio. Funções importantes são atribuídas ao endotélio vascular, como manutenção do tônus vascular, coagulação e fibrinólise, modulação da inflamação e agregação plaquetária. Estudos clínicos foram desenvolvidos no intuito de restaurar a função endotelial nas várias populações peculiares: diabéticos, saudáveis, hiperglicêmicos, hiperinsulinêmicos, hipertensos e hipercolesterolêmicos. Nesse sentido, intervenções com L-arginina, drogas de redução lipídica (estatinas), antioxidantes (vitamina C) e exercício físico parecem restaurar a função endotelial anormal. Mais especificamente, o exercício físico parece restaurar a síntese de óxido nítrico (ON), melhorando o vasorelaxamento vascular nesse tipo de indivíduo. O objetivo deste trabalho foi atualizar informações sobre função e disfunção endotelial no indivíduo com resistência à insulina e/ou diabetes melito. Metodologicamente, por meio de uma revisão da literatura, realizou-se uma pesquisa na base de dados MEDLINE e também foram utilizados outros trabalhos considerados relevantes. Foram relacionados 251 e 36 trabalhos, respectivamente, dentre os quais se aceitou um total de 127. Conclui-se que o indivíduo com resistência à insulina e/ou diabetes melito tem disfunção endotelial, alterando várias propriedades da função endotelial, e que o exercício físico pode recuperar algumas dessas propriedades.

**Unitermos:** Resistência à insulina, diabetes melito, disfunção endotelial, exercício físico.

#### ABSTRACT

Individuals with insulin resistance and diabetes mellitus have an increased cardiovascular morbidity and mortality, caused in part by vascular complications. Endothelial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of vascular diabetic disease. This abnormal function of the vasculature precedes the cardiovascular disease and is associated with impaired endothelium-dependent vasorelaxation. Important functions are attributed to the vascular endothelium, such as maintenance of the vascular tone, coagulation and fibrinolysis, modulation of inflammation and platelet aggregation. Clinical trials have been performed aiming at restoring endothelial function in several populations, such as diabetics, hyperglycemics, hyperinsulinemics, hypertensives and hypercholesterolemics. In this sense, interventions employing L-arginine, lipid-lowering drugs (statins), antioxidants (vitamin C) and physical exercise seem to restore abnormal

<sup>1</sup> Setor de Prevenção e Reabilitação Cardiovascular Unicardio, Hospital de Santa Catarina, Blumenau, SC. Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS.

Correspondência: Carlos Alberto da Silva, Av. 21 de Janeiro, 1770, Centro, 89107-000, Pomerode, SC. Fone: (47) 387-3397 ou 8423-3333. E-mail: carlos\_as@terra.com.br ou caalai@terra.com.br.

endothelial function. More specifically, physical exercise seems to restore the synthesis of nitric oxide, improving vasorelaxation in this type of patient. The objective of this study was to update information about endothelial function and dysfunction in patients with insulin resistance and/or diabetes mellitus. Our methodology consisted of a review of the literature on the MEDLINE database, and also included other relevant studies. We found 251 and 36 studies, respectively, and selected 127 among those. We conclude that patients with insulin resistance and/or diabetes mellitus present endothelial dysfunction, altering several endothelial function properties, and that physical exercise may restore some of these properties.

**Key words:** Insulin resistance, diabetes mellitus, endothelial dysfunction, physical exercise.

## INTRODUÇÃO

Os estados de resistência à insulina (RI), principalmente de obesidade central e diabetes melito (DM) ou seu precursor, tolerância à glicose prejudicada (IG) (1), são caracterizados por uma capacidade reduzida da insulina de estimular a entrada de glicose nas células musculares e adipócitos, inibindo a lipólise no tecido adiposo (2) devido a um inapropriado nível de insulina no plasma, necessário para manter a homeostase metabólica (3). A RI mediada pela disposição de glicose não está limitada a indivíduos com DM tipo 2, podendo ser demonstrada em indivíduos não-diabéticos, especialmente em indivíduos obesos (4,5). O risco de doença cardiovascular (DCV) está aumentado em indivíduos com RI e DM, onde esta pode ter um papel de causa, mas as ações fisiológicas diversas da insulina sugerem que outros mecanismos patofisiológicos também podem contar para o risco elevado de DCV (6). Existem evidências de que a função vascular difere entre indivíduos com DM tipo 1 e DM tipo 2 (7). As mudanças funcionais da parede arterial podem favorecer o desenvolvimento de DCV em indivíduos com RI. O termo “disfunção endotelial” surgiu na literatura científica de maneira a rotular convenientemente a alteração da função endotelial vascular.

O reconhecimento de que o endotélio vascular não é somente uma camada em linha dos vasos sanguíneos, mas tem um papel vital na manutenção do fluxo do sangue, tônus vascular e permeabilidade, levou a uma apreciação de que a disfunção endotelial é central a muitas doenças vasculares, incluindo a DCV e o DM (8-15) – este último é comum e afeta atualmente 5 a 20% da sociedade ocidental.

O objetivo desta revisão foi abordar as relações entre função e disfunção endotelial e RI e DM, com ênfase nos efeitos do exercício físico sobre a melhora da reatividade vascular.

Metodologicamente, os artigos desta revisão foram identificados em uma pesquisa de literatura reali-

zada na base de dados MEDLINE, além de artigos considerados relevantes mas que não constavam na base. A pesquisa ficou restrita a artigos em língua inglesa publicados entre 1990 e 2003. Como combinação de termos, utilizaram-se as seguintes expressões: “disfunção endotelial” como palavras em títulos; e “RI”, “DM” e “exercício físico” como palavras em qualquer parte do trabalho. A pesquisa incluiu artigos originais e de revisão, e, ao final, foram aceitos 127 de um total de 251 trabalhos da base de dados e 36 artigos considerados relevantes mas que não constavam da base. Os critérios de aceitação foram: estudos randomizados controlados com grupos de controles concorrentes; estudos com ao menos 4 semanas de intervenção; populações de resistentes à insulina e diabéticos; publicação completa em jornal examinado e revisado; disponibilidade de todas as medidas de avaliação endotelial antes, durante e depois da intervenção; revisões abordando patofisiologia, aspectos moleculares e intervenções farmacológicas e não-farmacológicas da função endotelial na RI e em diabéticos.

## DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA RI E NO DM

A progressão da doença macrovascular na RI e no DM está relacionada aos mecanismos de disfunção endotelial (16-20). Alterações no metabolismo de glicídios (hiperglicemia) e lipídeos, como a glicação não-enzimática de proteínas intra e extracelulares, o metabolismo de glicose via aldose-redutase com alterações da concentração de sorbitol-mioinositol, o aumento da síntese “de novo” do diacilglicerol proveniente de intermediários glicolíticos e subsequente ativação da via da proteína quinase C e o aumento da oxidação de proteínas e lipídeos, parecem estar diretamente relacionadas com a disfunção endotelial (21-27). O acentuado aumento do metabolismo da glicose na hiperglicemia diabética está associado a uma formação aumentada de

radicais livres (espécies de oxigênio reativo que, por conter elétrons não-pareados, são instáveis, mostrando intensa reatividade química, reagindo localmente, aceitando ou doando elétrons a outras moléculas para alcançar um estado mais estável) (28-31). Exemplos de radicais livres e algumas fontes incluem: radical hidroxila (OH), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), metais de transição como o ferro e cobre, peroxinitrito (ONOO-), enzima conversora de angiotensina (ACE), lipoproteína de baixa densidade (LDL), ativador mitogênico de proteína quinase (MAPK), nicotinamida dinucleotida (fosfato) (NADH/NAD(P)H), fator nuclear kappa B (NF-[kappa]B), lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (ox-LDL), superóxido desmutase (SOD) (32-39).

A hiperinsulinemia compensatória ou RI tem sido identificada como um defeito inicial no desenvolvimento do DM, particularmente na presença de obesidade, sedentarismo ou dietas ricas em gordura (40,41). Tem sido proposto que a hiperinsulinemia seria um fator de risco independente para aterosclerose (42-45). Com efeito, trata-se de um peptídeo intensamente aterogênico, estimulando a produção de lipídeos, a proliferação de células musculares lisas, a síntese de colágeno e a produção de vários fatores de crescimento (46,47). Enquanto muita atenção foi dirigida à toxicidade da glicose, a possibilidade de toxicidade da insulina recebeu pouco interesse (48-50). A RI vascular, por si só, parece ser um fator principal na patologia vascular associada com obesidade central, hipertensão arterial (HA), dislipidemia e DM. Os papéis relativos da RI e da hiperinsulinemia na patologia vascular têm sido amplamente discutidos, mas nenhum dado definitivo provê um meio objetivo de avaliar separadamente as contribuições (51). Dados epidemiológicos disponíveis sugerem uma associação entre hiperinsulinemia e DCV, mas isso pode ser interpretado igualmente como um reflexo da RI (52).

Importante consideração deve ser dada ao estudo de Gaenger et al. (53), onde os autores evidenciam que, se por um lado, a hiperinsulinemia endógena prejudica o endotélio vascular, por outro, a infusão de insulina exógena parece melhorar a função endotelial em indivíduos com DM tipo 2. Porém, Playford & Watts (1) dizem que essa melhora ocorrida pela infusão de insulina está presente somente em indivíduos normais, potencializando a vasodilatação pela acetilcolina através da liberação de ON das células endoteliais. Portanto, a resposta vasodilatadora à insulina é perdida na RI, e o fluxo sanguíneo ao músculo esquelético é diminuído, possivelmente pela sensibilidade adrenérgica aumentada (54).

Inferindo-se sobre a base molecular da RI, o gene GLUT4 propriamente dito está normal no DM. Por outro lado, o que parece ter uma maior associação com a

RI são os ácidos graxos livres (FFA) e os triglicérides (55). Os FFA parecem atrapalhar a ativação de insulina do GLUT4, seja pelo seu efeito no tráfego vesicular, por inibir a atividade de GLUT4 ou por interferir na cascata sinalizadora de insulina (56).

A RI – ou sua síndrome na disfunção endotelial – está diretamente relacionada com marcadores celulares homeostáticos, inflamatórios e endoteliais (57-59). Esses marcadores celulares ou fatores derivados do endotélio podem modificar profundamente a função plaquetária, bem como o estado contrátil e proliferativo das células musculares lisas vasculares (VSMC), tais como: fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) ou ON e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), vasodilatadores e potentes inibidores da função plaquetária e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Por outro lado, as células endoteliais podem também produzir substâncias vasoconstritoras e promotoras de crescimento celular (por estimular a proliferação das VSMC), tais como: endotelina-1 (ET-1) (60), angiotensina II, tromboxane A<sub>2</sub> e prostaglandina A<sub>2</sub> (PGH 2). Outros marcadores também estão alterados, como: proteína C-reativa (CRP) (61), fator von Willebrand (vWF) (62-64), trombosmodulina (65), selectina-E, molécula de adesão intracelular (ICAM), molécula de adesão à célula vascular (VCAM), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (66,67), inibidor do ativador do plasminogênio tipo-1 (PAI-1), ativador do tecido do plasminogênio (t-PA), inibidor do caminho do fator de tecido (TFPI) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (68).

Portanto, parece que o papel da RI e/ou do DM, bem como o possível envolvimento confundidor de outros fatores de DCV, como obesidade central (69-71), HA (72-77) e dislipidemia, dão evidências de que, na disfunção vascular, o papel protetor do endotélio está diminuído, ao passo que a produção de mediadores vasoconstritores, pró-agregatórios e pró-mitogênicos está mantida ou acentuada.

## ON versus endotelina

Um aspecto central da função endotelial prejudicada na presença de RI e/ou DM, bem como de fatores para DCV, é o prejuízo na bioatividade do ON derivado do endotélio (NOED) (78). Presumivelmente, existe uma perda de produção endotelial e/ou biodisponibilidade de ON nessas desordens (79-82). O ON é sintetizado da L-arginina precursora em uma reação catalisada pela síntese endotelial de ON (eNOS) e continuamente liberado do endotélio. O NOED regula o tônus vascular através de uma ação dilatadora sobre as células vasculares do músculo liso que dependem da ativação de guanilato ciclase e estimula a geração de guanosina monofosfato

cíclico (cGMP), o qual, por sua vez, leva a uma diminuição nos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$ , resultando em um relaxamento do músculo liso e vasodilatação (83). Numerosas condições caracterizadas por uma disponibilidade prejudicada de ON têm revelado associação com a síntese acentuada de ET-1 (84).

Dados sugerindo uma ligação entre insulina e ET-1 provêm uma nova dimensão a essa questão (51). De particular interesse são as descobertas que destacam um efeito significativo da insulina de estimular diretamente a produção e liberação de ET-1 das células endoteliais (85). A ET-1 é um potente vasoconstritor peptídeo secretado pelas células endoteliais em resposta a insulina e outros agonistas (86), e os níveis circulantes desse vasoconstritor estão elevados em sujeitos com RI (87,88) e naqueles com aterosclerose (89), sugerindo uma possível ligação patogênica; porém, sua concentração sérica em indivíduos normais é baixa. Os níveis circulantes de ET-1 foram registrados (90), mas não em todos (91,92) os estudos de RI em humanos. Verificou-se que a elevação de ET-1 é proporcional à hiperinsulinemia (93) e que a perda de peso devido à dieta e ao exercício físico pode reduzir as concentrações de insulina e ET-1 (94). Além disso, elevações nos níveis circulantes de insulina por administração exógena em controles normais e em sujeitos com RI demonstraram elevar agudamente a ET-1 circulante (95,96), embora, de novo, descobertas desencontradas existam (97,98).

## EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO

As manifestações clínicas da DCV dependem de alguns processos patofisiológicos inter-relacionados, dentre as quais a disfunção endotelial é apenas uma (99,100). Autores argumentam que o endotélio tem um papel vital na aterosclerose e suas manifestações (101-106). Para tanto, terapias de tratamento farmacológico – como redução de colesterol (107), antioxidantes (108), estrógeno, bloqueadores de canais de  $Ca^{++}$ , L-arginina (109) e outros – e não-farmacológico – exercício físico – estão sendo bastante evidenciadas em ensaios clínicos (110,111).

Mais especificamente, o exercício físico parece ser um meio eficaz para se melhorar a função endotelial anormal em indivíduos com RI e/ou DM. Há uns 20 anos, estudos vêm mostrando cada vez mais evidências de que o exercício físico pode modificar o controle da resistência vascular (112,113). A vasodilatação dependente do endotélio (ON) não está prejudicada somente com a DCV evidente, mas também com fatores de risco vasculares convencionais, como o DM e a síndrome plurimetabólica ou síndrome X, que podem melhorar com intervenções apropriadas. Especificamente em pa-

cientes DM tipo 2 não dependentes de insulina, a função dependente do endotélio (ON) geralmente tem se revelado deprimida. A disfunção endotelial é considerada uma manifestação prematura e integral da DCV (aterosclerótica), e a melhora dessa função reflete benefício antiaterogênico. Percebeu-se que a prática de exercício físico ou aumentos crônicos no fluxo de sangue induzem a melhoras na função vascular dependente do endotélio (114).

O fato de a função endotelial estar anormal na RI e no DM faz do exercício físico um importante e fundamental aliado no tratamento dos indivíduos com essas características. No estudo de Di Carli et al. (115), que incluiu 35 indivíduos (18 DM tipo 1, 17 DM tipo 2 e 11 controles) e utilizou a tomografia de emissão de pósitrons como avaliação, verificou-se que, nos indivíduos com DM, a função endotelial estava prejudicada, diferentemente do grupo controle. A principal nova descoberta dos últimos anos é que o treinamento de exercício melhora a função endotelial prejudicada na RI e no DM. Maiorana et al. (114), em seu estudo com 15 indivíduos diabéticos divididos em dois grupos, onde um dos grupos participou de 8 semanas de treinamento de exercício aeróbico e de circuito, evidenciaram que houve melhora da função endotelial. Isso está de acordo com outros estudos com pacientes com essas alterações (116,117). Índícios sugerem que essa melhora da função endotelial ocorre pelo aumento na biodisponibilidade da eNOS.

A relevância clínica potencial dessas descobertas está destacada pelo papel crítico do ON como uma molécula antiaterogênica. Altos níveis de morbidade e mortalidade cardiovascular no DM tipo 2 e descobertas prévias de intervenções que possam melhorar a função endotelial (112-117) também estão associados com morbidade e mortalidade melhorada. Os efeitos benéficos do exercício sobre a função vascular estão relacionados ao fluxo elevado (implicando adaptações crônicas do sistema vasodilatador), ao despojo do estresse sobre o endotélio (não somente pelo fluxo elevado, mas também pelas alterações hemodinâmicas, frequência cardíaca, pressão arterial e efeitos metabólicos perto da vascularidade), a efeitos metabólicos gerais e ao aumento sustentável sobre a síntese de ON (114).

Lavrencic et al. (116) estudaram 30 homens saudáveis com síndrome plurimetabólica avaliados pelo eco-Doppler ultra-som da artéria braquial após uma intervenção com exercício aeróbico durante 12 semanas, três vezes por semana, na qual melhorou a dilatação dependente do endotélio com uma resposta sistêmica. Maiorana et al. (114) confirmam esse achado, destacando que o efeito do treinamento de exercício físico parece ser generalizado, e não restrito ao leito vascular do músculo esquelético especificamente treinado.

Rigla et al. (117), avaliando 27 sujeitos diabéticos tipo 1 e tipo 2 com exame de sangue laboratorial, que fizeram exercício físico três vezes por semana, durante 3 meses, com uma intensidade de 65 a 75% da frequência cardíaca máxima obtida por teste de esforço, mostraram que, além de melhorar outras anormalidades metabólicas, ou justamente em adição a essas melhoras, o treinamento físico normalizou as altas concentrações de trombomodulina (TM) no plasma.

Um aspecto importante desse tipo de intervenção nesses indivíduos é que, além da influência na função do endotélio vascular, outros benefícios são adquiridos, tais como: as condições cardiorrespiratórias e musculares estão aumentadas, implicando associação com menores riscos de DCV (118); a pressão arterial (PA) está fortemente melhorada (119); o exercício proporciona um perfil menos aterogênico de lipídeos (120); melhora da sensibilidade à insulina, fato que melhora os fatores de risco da DCV; melhora marcante do controle glicêmico (121); contribuição para mudanças na composição corporal (diminui a obesidade); e bem-estar psicológico (122).

A inatividade física resulta em sensibilidade à insulina marcadamente diminuída (123). No estudo de Duncan et al. (124), com treinamento de exercício aeróbico de 6 meses de duração avaliando a sensibilidade à insulina em 18 indivíduos sedentários, observou-se um aumento na atividade de sensibilidade à insulina, sem perda de peso e mudanças de lipídeos de jejum. Pérez-Martin et al. (4) chegaram a essa melhora em seu estudo. Por outro lado, bastam 5 dias de destreinamento para reduzir significativamente a melhora induzida pelo treinamento na ação da insulina e, concomitantemente, na entrada muscular de glicose (125). Entretanto, a atividade física regular, além de influenciar positivamente o metabolismo de glicose em estados de RI, melhora também outros fatores da síndrome X.

Muito importante e merecedor de destaque é o nível de intensidade do exercício físico para estimular melhora na função endotelial. As recomendações mais comuns propõem exercícios de intensidade leve a moderada (126). Poucos estudos focalizaram a intensidade do exercício, embora Tanasescu et al. (127) tenham encontrado, em sua pesquisa, que o aumento da intensidade melhorou o risco de DCV e morte em indivíduos diabéticos.

## CONCLUSÕES

O estado de RI diminui a capacidade da insulina de estimular a entrada de glicose nas células musculares e nos adipócitos. O risco de DCV está aumentado na

RI e no DM, e inicialmente à DCV parece ocorrer disfunção do endotélio vascular.

A hiperinsulinemia, quadro encontrado na RI e/ou no DM, está associada à formação de radicais livres, como OH ou O<sub>2</sub>. A hiperinsulinemia está identificada como um defeito inicial no desenvolvimento do DM, intensificando a aterogênese pela estimulação de lipídeos, proliferação de VSMC, síntese de colágenos e produção de alguns fatores de crescimento. A RI associada com obesidade central, HA, dislipidemia e DM está diretamente relacionada com a patologia vascular. Doses aumentadas de insulina exógena, agudamente, parecem melhorar a disfunção endotelial, embora doses aumentadas endógenas pareçam prejudicar a função endotelial normal. Os FFA e triglicerídeos parecem prejudicar a ativação de insulina no GLUT4.

Ocorre um prejuízo na biodisponibilidade de ON, sendo este considerado um aspecto central da disfunção endotelial na presença de RI e/ou DM, bem como de fatores para DCV. Outro aspecto é a produção de ET-1 nos indivíduos com RI, onde este, que é um potente vasoconstritor, está elevado.

O exercício físico aeróbico parece ser um meio eficaz no tratamento da disfunção endotelial em indivíduos com RI e/ou DM, além de trazer outras melhoras metabólicas e hemodinâmicas.

## REFERÊNCIAS

1. Playford D, Watts GF. Endothelial dysfunction, insulin resistance and diabetes: exploring the web of causality. *Aust N Z J Med* 1999;29(4):523-34.
2. Baron AD. Insulin resistance and vascular function. *J Diabetes Complications* 2002;16:92-102.
3. O'Doherty R, Stein D, Foley J. Insulin resistance. *Diabetologia* 1997;40:B10-5.
4. Pérez-Martin A, Raynaud E, Mercier J. Insulin resistance and associated metabolic abnormalities in muscle: effects of exercise. *Obes Rev* 2001;2:47-59.
5. Martin Jadraque L, Mostaza JM. Endothelial dysfunction and metabolic syndrome. *Rev Esp Cardiol* 1998;51(Suppl 4):19-23.
6. Thorne S, Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, Deanfield JE. Early endothelial dysfunction in adults at risk from atherosclerosis: different responses to L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1998;32(1):110-6.
7. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39(4):287-324.

8. Tooke JE, Goh KL. Endotheliopathy precedes type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1998;21(12):2047-9.
9. López-Farré A, Farré J, Sánchez de Miguel L, Romero J, González-Fernández F, Casado S. Endothelial dysfunction: a global response. *Rev Esp Cardiol* 1998;51(Suppl 6):18-22.
10. Bellamy MF, Goodfellow J, Tweddel AC, Dunstan FD, Lewis MJ, Henderson AH. Syndrome X and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 1998;40(2):410-7.
11. McVeigh GE, Cohn JN. Endothelial dysfunction and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 2003;3(1):87-92.
12. Feener EP, King GL. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: role in cardiovascular disease. *Heart Fail Monit* 2001;1(3):74-82.
13. Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51(12):3517-23.
14. Wascher TC. Endothelial transport processes and tissue metabolism: evidence of microvascular endothelial dysfunction in insulin-resistant diseases? *Eur J Clin Invest* 1997;27(10):831-5.
15. Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997;46(Suppl 2):S9-13.
16. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation* 2002;105(5):576-82.
17. Jonkers JJ, van de Ree MA, Smelt AH, de Man FH, Jansen H, Meinders AE, van der Laarse A, Blauw GJ. Insulin resistance but not hypertriglyceridemia per se is associated with endothelial dysfunction in chronic hypertriglyceridemia. *Cardiovasc Res* 2002;53(2):496-501.
18. Goodfellow J, Owens D, Henderson A. Cardiovascular syndrome X, endothelial dysfunction and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;31(Suppl):S163-71.
19. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 2002;51(4):1157-65.
20. Fujita H. Vascular endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus. *Nippon Rinsho* 1999;57(3):573-7.
21. Nishio Y, Kashiwagi A. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Nippon Rinsho* 2001;59(12):2451-9.
22. Pieper GM, Meier DA, Hager SR. Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Am J Physiol* 1995;269(3 Pt 2):H845-50.
23. McVeight GE. Hyperinsulinemia, insulin resistance, and endothelial dysfunction. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994;3(4):365-9.
24. Lee IK, Kim HS, Bae JH. Endothelial dysfunction: its relationship with acute hyperglycaemia and hyperlipidemia. *Int J Clin Pract* 2002;129:59-64.
25. Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(6):1055-9.
26. Hink U, Li H, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88(2):E14-22.
27. Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32(Suppl 3):S54-61.
28. Graier WF, Posch K, Fleischhacker E, Wascher TC, Kostner GM. Increased superoxide anion formation in endothelial cells during hyperglycemia: an adaptive response or initial step of vascular dysfunction? *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45(2 Suppl 3):153-60.
29. Watts GF, Playford DA. Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non-insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141(1):17-30.
30. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994;16(3):383-91.
31. Testamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992;263(2 Pt 2):H321-6.
32. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 2003;79(930):195-200.
33. Shinozaki K, Hirayama A, Nishio Y, et al. Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(7):1821-8.
34. Gopaul NK, Manraj MD, Hebe A, et al. Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia* 2001;44(6):706-12.
35. Perticone F, Eravolo R, Candigliota M, et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: prospective effect of vitamin C. *Diabetes* 2001;50(1):159-65.

36. Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Toda N, Kikkawa R. Free radical production in endothelial cells as a pathogenetic factor for vascular dysfunction in the insulin resistance state. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45(2-3):199-203.
37. Bayraktutan U. Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes Metab* 2002;4(4):224-38.
38. De Angelis L, Marfella MA, Siniscalchi M, et al. Erectile and endothelial dysfunction in type II diabetes: a possible link. *Diabetologia* 2001;44(9):115-60.
39. Soriano FG, Virág L, Szabó C. Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med* 2001;79(8):437-48.
40. Guerci B, Keamey-Schwartz A, Böhme P, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. *Diabetes Metab* 2001;27(4 Pt 1):425-34.
41. Guerci B, Böhme P, Keamey-Schwartz A, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 2: altered endothelial function and the effects of treatments in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2001;27(4 Pt 1):436-47.
42. Balletshofer BM, Rittig K, Volk A, et al. Impaired non-esterified fatty acid suppression is associated with endothelial dysfunction in insulin resistant subjects. *Horm Metab Res* 2001;33(7):428-31.
43. Meeking DR, Cummings MH, Thorne S, et al. Endothelial dysfunction in type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. *Diabet Med* 1999;16(10):841-7.
44. Kashiwagi A, Asahima T, Nishio Y, et al. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction endothelial cells. *Diabetes* 1996;45(Suppl 3):S84-6.
45. Chakir M, Plante GE. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54(1):45-51.
46. O'Brien SF, Watts GF, Playford DA, Burke V, O'Neal DN, Best JD. Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabet Med* 1997;14(11):974-8.
47. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of angiopathy. *Cardiovasc Res* 1997;34(1):55-68.
48. Gwinup G, Elias AN. Hypothesis: insulin is responsible for the vascular complications of diabetes. *Med Hypotheses* 1991;34:1-6.
49. Oballetshofer BM, Rittig K, Enderle MD, et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000;101(15):1780-4.
50. Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15(4):274-82.
51. Mather K, Anderson T, Verma S. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J Vasc Res* 2001;38:415-422.
52. De Verise AS, Verbeuren TJ, van de Voorde J, Lamiere NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000;130(5):963-74.
53. Gaenger H, Neumayr G, Marschang P, et al. Effect of insulin therapy on endothelium-dependent dilation in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002;89:431-4.
54. Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res* 1997;34(1):164-8.
55. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, et al. Endothelial dysfunction in small resistance arteries of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Hypertens* 2001;19(5):913-9.
56. Bloomgarden ZT. American Association of Endocrinologists (AAE) Consensus Conference on the Insulin Resistance Syndrome, 2002. *Diabetes Care* 2003;26(3):933-9.
57. Marques-Vidal P, Mazoyer E, Bongard V, et al. Prevalence of insulin resistance syndrome in southwestern France and its relationship with inflammatory and hemostatic markers. *Diabetes Care* 2002;25(8):1371-7.
58. Kolasinska KW, Lesniak W, Kiec WB, Malczewska MM. Biochemical parameters of endothelial dysfunction in cardiometabolic syndrome X. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62(1):7-13.
59. Wardle EN. Endothelial cell dysfunction in diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(5):1336.
60. Predel HG, Meyer-Lehnert H, Bäcker A, Stelkens H, Kramer H. Plasma concentrations of endothelin in patients with abnormal vascular reactivity: effects of ergometric exercise and acute saline loading. *Life Sciences* 1990;47:1837-43.
61. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines

- originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(4):972-8.
62. Seligman BGS, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N. Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dislipidemia. *Diabetes Care* 2000;23(9):1395-400.
  63. Lip GY, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? *Cardiovasc Res* 1997;34(2):255-65.
  64. Vermes I, Spooren PF, Klsbeek-Batenburg EM, Haanen C. In addition to von Willebrand factor and urinary albumin excretion, plasma endothelin is an indicator of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35(6):555-9.
  65. Leurs PB, Stolk RP, Hamulyak K, van Oerle R, Grobbee DE, Wolffenbuttel BHR. Tissue factor pathway inhibitor and other endothelium-dependent hemostatic factors in elderly individuals with normal or impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(8):1340-5.
  66. Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M. Increased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in diabetic macrovasculopathy. *Cardiovasc Pathol* 1999;8(3):145-51.
  67. Winkler G, Lakatos P, Salamon F, et al. Elevated serum TNF- $\alpha$  level as a link between endothelial dysfunction and insulin resistance in normotensive obese patients. *Diabet Med* 1999;16(3):207-11.
  68. Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol* 2003;162(1):303-12.
  69. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 1996;97(11):2601-10.
  70. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999: dyslipidemia, endothelial dysfunction, and glycosylation. *Diabetes Care* 2000;23(5):690-8.
  71. Bakker SJ, Ijzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, Heine RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* 2000;148(1):17-21.
  72. Taylor AA. Pathophysiology of hypertension and endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30(4):983-97.
  73. Zizek B, Poredos P. Insulin resistance adds to endothelial dysfunction in hypertensive patients and in normotensive offspring of subjects with essential hypertension. *J Intern Med* 2001;249(2):189-97.
  74. Preik M, Kelm M, Rösen P, Tschöpe D, Strauer BE. Additive effect of coexistent type 2 diabetes and arterial hypertension on endothelial dysfunction in resistance arteries of human forearm vasculature. *Angiology* 2000;51(7):545-54.
  75. Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoening ME, Miller AW. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 2):R788-92.
  76. Pettine GA. Arterial hypertension and diabetes mellitus: role of endothelial dysfunction. *Clin Ter* 2000;151(2):111-7.
  77. Khder Y, Briançon S, Petermann R, et al. Shear stress abnormalities contribute to endothelial dysfunction in hypertension but not in type II diabetes. *J Hypertens* 1998;16(11):1619-25.
  78. Ouviaña SM, La Greca RD, Zanaro NL, Palmer L, Sasseti B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res* 2001;102(2):107-14.
  79. Gewalting MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 2002;55:250-60.
  80. Pepine CJ. Clinical implications of endothelial dysfunction. *Clin Cardiol* 1998;21(11):795-9.
  81. Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension* 1998;31(5):1047-60.
  82. Sobrevia L, Mann GE. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signaling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol* 1997;83(3):423-52.
  83. Goligorsky MS, Chen J, Brodsky S. Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy: focus on nitric oxide. *Hypertension* 2001;37(2 Part 2):744-8.
  84. Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction and nitric oxide synthase. *Kidney* 2000;58(3):1360-76.
  85. Anfonssi G, Cavalot F, Massucco P, et al. Insulin influences immunoreactive endothelin release by human vascular smooth muscle cells. *Metabolism* 1993;42:1081-3.
  86. Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med* 2003;20:255-68.
  87. Piatti PM, Monti LD, Galli L, et al. Relationship between endothelin-1 concentration and



- metabolic alterations typical of the insulin resistance syndrome. *Metabolism* 2000;49:748-52.
88. Irving RJ, Noon JP, Watt GCM, Webb DJ, Walker BR. Activation of the endothelin system in insulin syndrome. *QJM* 2001;94:321-6.
  89. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heblin DM, Sandberg SM, Burnett JJ. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:997-1001.
  90. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:1856-62.
  91. Kanno K, Hirata Y, Shichiri M, Marumo F. Plasma endothelin-1 levels in patients with diabetes mellitus with or without vascular complication. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991;17(Suppl 7):S475-6.
  92. Bertello P, Veglio F, Pinna G, et al. Plasma endothelin in NIDDM patients with and without complications. *Diabetes Care* 1994;17:574-7.
  93. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito M, Spada RS. Plasma endothelin-1 concentrations in non-insulin-dependent diabetes mellitus and nondiabetic patients with chronic arterial obstructive disease of the lower limbs. *Int Angiol* 1998;17:97-102.
  94. Ferri C, Pittoni V, Piccoli A, et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:829-35.
  95. Cardillo C, Nambi SS, Kilcoyne CM, et al. Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm. *Circulation* 1999;100:820-5.
  96. Ferri C, Bellini C, Desideri G, De Mattia G, Santucci A. Endogenous insulin modulates circulating endothelin-1 concentrations in humans. *Diabetes Care* 1996;19:504-6.
  97. Katsumori K, Wasada T, Saeki A, Naruse M, Omori Y. Lack of acute insulin effect on plasma endothelin-1 levels in humans. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;32:187-9.
  98. Gottsater A, Rendell M, Anwaar I, Lindgarde F, Hulthen UL, Mattiasson I. Increasing neopterin and decreasing endothelin-1 in plasma during insulin infusion in women. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:417-24.
  99. Garcia Soriano F, Virág L, Jagtap P, et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 2001;7(1):108-13.
  100. Schiekofer S, Balletshofer B, Andrassy M, Bierhaus A, Nawroth PP. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(5):503-11.
  101. Watts GF, Playford DA, Croft KD, Ward NC, Morri TA, Burke V. Coenzyme Q(10) improves endothelial dysfunction of the brachial artery in type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002;45(3):420-6.
  102. Rösen P, Du X, Sui GZ. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction in the diabetic heart. *Adv Exp Med Biol* 2001;498:75-86.
  103. Kimura Y, Matsumoto M, Miyauchi E, Deng YB, Iwai K, Hattori H. Noninvasive detection of endothelial dysfunction in elderly with NIDDM by ultrasonography. *Echocardiography* 2001;18(7):559-64.
  104. Lee SJ, Lee DW, Kim KS, Lee IK. Effect of estrogen on endothelial dysfunction in postmenopausal women with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;54(Suppl 2):S81-92.
  105. Price KD, Price CS, Reynolds RD. Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001;158(1):1-12.
  106. De Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39(4):325-42.
  107. Sheu WH, Chen YT, Lee WJ. Improvement in endothelial dysfunction with LDL cholesterol level < 80 mg/dl in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001;24(8):1499-501.
  108. Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 2000;47(3):457-64.
  109. Piegas Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch C, Schofield PM. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1996;28(7):1796-804.
  110. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(3):631-8.
  111. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev* 2001;22(1):36-52.
  112. Baldeweg SE, Pink AM, Yudikin JS, Coppack SW. The relationship between obesity, vascular reactivity and endothelial dysfunction in subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24(Suppl 2):S134-5.
  113. Wascher TC, Graier WF, Bahadori B, Toplak H. Time course of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 1994;90(2):1109-10.
  114. Maiorana A, O'Driscoll G, Cheetham C, et al. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:860-6.

115. Di Carli MF, Janisse J, Grunberger G, Ager J. Role of chronic hyperglycemia in the pathogenesis of coronary microvascular dysfunction in diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(8):1387-93.
116. Lavrencic A, Salobir BG, Keber I. Physical training improves flow-mediated dilation in patients with the polymetabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:551-5.
117. Rigla M, Fontcuberta J, Mateo J, et al. Physical training decreases plasma thrombomodulin in type I and type II diabetic patients. *Diabetologia* 2001;44:693-9.
118. Vanninen E, Uusitupa M, Siitonen O, Laitinen Länsilä E. Habitual physical activity, aerobic capacity and metabolic control in patients with newly diagnosed type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: effects of one year diet and exercise intervention. *Diabetologia* 1992;35:340-6.
119. Lehmann R, Vocak A, Niedermann K, Agosti K, Spinas GA. Loss of abdominal fat and improvement of the cardiovascular risk profile by regular moderate exercise training in patients with NIDDM. *Diabetologia* 1995;38:1313-9.
120. Sunami Y, Motoyama M, Kinoshita F, et al. Effects of low-intensity aerobic training on the high-density lipoprotein cholesterol concentration in healthy elderly subjects. *Metabolism* 1999;48:984-8.
121. Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Exercise training in obese diabetic patients. Special considerations. *Sports Med* 1992;14:171-89.
122. Brownell KD. Exercise and obesity treatment: psychological aspects. *Int Obes* 1995;19:S122-5.
123. Rice B, Janssen I, Hudson R, Ross R. Effects of aerobic or resistant exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. *Diabetes Care* 1999;22:684-91.
124. Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensibility and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. *Diabetes Care* 2003;26(3):557-62.
125. Vukovich MD, Arciero PJ, Kohrt WM, Racette SB, Hansen PA, Holloszy JO. Changes in insulin action and Glut 4 with 6 days of inactivity in endurance runners. *J Appl Physiol* 1996;80:240-4.
126. Basdevant A, Laville M, Ziegler O. [Practice guideline for the diagnosis, prevention and treatment of obesity in France]. *Diabetes Metab* 1995;24:10-42.
127. Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Hu FB. Physical activity in relation to cardiovascular disease and total mortality among men with type 2 diabetes. *Circulation* 2003;107:2435-9.