

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Avaliação da Função Endotelial em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo1**  
**Através da Dilatação Arterial Mediada por Fluxo: Associações com o Tempo de**  
**Diabetes e o Controle Glicêmico**

**GISLAINE VISSOKY CÉ**

**Porto Alegre**

**2009**

**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**

**GISLAINE VISSOKY CÉ**

**Avaliação da Função Endotelial em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo1**  
**Através da Dilatação Arterial Mediada por Fluxo: Associações com o Tempo de**  
**Diabetes e o Controle Glicêmico**

**Orientador: Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre.**

**Porto Alegre**

**2009**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, pelo incentivo à pesquisa, pela oportunidade de participar deste Curso de Pós-Graduação e pela valorosa orientação neste projeto, que me proporcionou grande crescimento pessoal.

Ao meu marido, João Francisco Cé, que tem acompanhado minha trajetória profissional desde o primeiro ano da Faculdade de Medicina, pela compreensão e apoio durante a realização desta etapa.

Ao Dr Antônio Vargas da Silva pela disponibilidade e competência para realização das ecografias dos pacientes deste estudo.

Às Dras Márcia K Puñales e Adriana Fornari pelo incentivo, pela incansável contribuição na seleção de pacientes do Instituto da Criança com Diabetes e pela ajuda técnica na conclusão deste trabalho.

Às enfermeiras Paula Mondadori e Marjorie Silva e equipe de enfermagem do Instituto da Criança com Diabetes.

Ao Dr. Balduino Tschiedel, diretor presidente do Instituto da Criança com Diabetes, pela oportunidade de fazer esta pesquisa no Serviço.

Aos demais colegas que, de alguma maneira, me ajudaram na realização deste projeto.

Aos pacientes, pela disponibilidade, paciência e boa vontade com que participaram desta pesquisa.

*Ao meu querido pai pelo seu valoroso exemplo como médico e á minha adorada mãe, professora universitária aposentada, grande incentivadora para a realização deste projeto*

*Ao meu marido pelo apoio em todas as etapas da minha vida.*

*À minha filha Giovanna pela compreensão.*

**Este projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Diabetes Association*

AGEs: Produtos avançados da glicação protéica

BH4: Tetraidrobiopterina

CA: Cintura abdominal

DCCT: *Diabetes Control and Complications Trial*

DE: Disfunção endotelial

DM: Diabetes Mellitus

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

DMF: Dilatação arterial mediada por fluxo

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDIC: *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study*

EIMC: Espessamento das camadas íntima e média carotídeas

EROs: Espécies reativas de oxigênio

EUA: Excreção urinária de albumina

GAD: Ácido glutâmico-decarboxilase

Gca: Enzima guanilato ciclase

GLUT: Facilitador do transporte de glicose

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

IECA: Inibidor da enzima conversora da angiotensinaII

IL-6: Interleucina-6

IMC: Índice de massa corporal

LDL: *Low -density lipoprotein*

NAD: Neuropatia autonômica diabética

NADPH: Adenosina difosfato

NFkB: Fator de transcrição celular que regula a resposta inflamatória

NO: Óxido nítrico

e-NOS: Enzima óxido nítrico sintase endotelial

ONOO-: Peroxinitrito

PAD: Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

PCR-US: Proteína C reativa ultra-sensível

PKC: Proteína quinase C

SOD: Enzima superóxido dismutase

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral- $\alpha$

Vwf; Fator de Von Willebrand

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese e liberação de NO no endotélio vascular .....	28
Figura 2: Superprodução de superóxido na mitocôndria e ativação de vias alternativas de metabolismo da glicose.....	35
Figura 3: A via dos polióis .....	36
Figura 4: Formação de peroxinitrito através da superprodução de NO e superóxido	37
Figura 5: O ciclo vicioso da memória metabólica .....	42



## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1 - Clinical and biochemical characteristics of T1DM patients and non- diabetic subjects .....	90
Table 2 - Clinical and biochemical characteristics of T1DM patients with and without endothelial dysfunction .....	91
Table 3 – Clinical and biochemical characteristics of T1DM patients with less than 5 years of disease with and without endothelial dysfunction .....	92
Table 4 –Flow-mediated dilation and nitrate-mediated dilation and vascular parameters in T1DM patients and non-diabetic subjects .....	93
Table 5A - Pearson’s correlation between flow- mediated dilation (FMD) and HbA1c at different moments from the vascular test in T1DM patients.....	94
Table 5B - Pearson’s correlation between flow- mediated dilation (FMD) and HbA1c at different moments from the vascular test in T1DM patients.....	95
Table 6 - Intensive self monitoring blood glucose (SMBG).....	96

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 - Flow- mediated dilation and nitrate-mediated dilation of type1 patients and non-diabetic subjects.....	97
Figure 2 - Pearson's Correlation between duration of T1DM and presence of endothelial dysfunction .....	98
Figure 3 - Pearson's Correlation between flow- mediated dilation ( expressed as % of dilation from baseline) and mean HbA1c obtained 12 to 24 months before ultrasound (long-term control) (A) and from the day of ultra-sound to 12 months before the ultrasound analysis (short-term control) (B), in adolescents with Type 1 diabetes with less than 5 years of disease (n=28). .....	99
Figure 4 – Flow-mediated dilation (%) in adolescents with Type 1 diabetes with or without microalbuminuria and non-diabetics controls. Data are Mean and Standart deviation. ANOVA with Bonferroni.....	100

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	3
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO.....	9
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO .....	10
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	21
2.1 Diabetes Mellitus tipo 1.....	21
2.1.1 Definição .....	21
2.1.2. Epidemiologia.....	21
2.1.3 Sub-Classificação do Diabetes Mellitus tipo 1.....	22
2.1.4 Etiopatogenia do Diabetes Mellitus tipo 1 .....	22
2.1.5 História natural do Diabetes Mellitus tipo 1.....	23
2.1.6. Complicações crônicas do Diabetes: .....	24
2.2 Disfunção Endotelial no Diabetes Mellitus tipo 1.....	25
2.2.1 O Endotélio Normal .....	25
2.2.2 O óxido nítrico.....	27
2.2.3 Disfunção Endotelial .....	29
2.2.4 Métodos de avaliação da função endotelial:.....	30
2.3. Mecanismos de Disfunção Endotelial no Diabetes tipo 1 .....	33
2.3.1 O estresse oxidativo.....	33
2.3.2 Ativação da via dos polióis.....	35

2.3.3. Ativação da proteína c quinase.....	36
2.3.4. Formação de produtos finais de glicação avançada.....	36
2.3.5 O tempo de Diabetes tipo1 e a função endotelial .....	38
2.3.6 O controle glicêmico recente e histórico na função endotelial.....	38
2.4 Complicações microvasculares no Diabetes tipo1 e a disfunção endotelial .....	43
2.5 DE como marcador de risco cardiovascular no DM1.....	45
2.6 Manejo clinico da disfunção endotelial no DM1 .....	47
3 JUSTIFICATIVA .....	51
4.OBJETIVOS.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....	55
6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS.....	73
7.CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	102
8. ANEXOS.....	105

## RESUMO

### **Disfunção Endotelial ocorre em Adolescentes com menos de 5 anos de Diabetes Mellitus tipo 1 e está Associada à Microalbuminúria e ao Controle Glicêmico de Longo Prazo**

GISLAINE VISSOKY CÉ, ANTÔNIO MARCOS VARGAS DA SILVA, MÁRCIA K C PUÑALES, ANDRÉA CAUDURO DE CASTRO, LUIS EDUARDO ROHDE, MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) está associado a uma incidência aumentada de doença micro e macrovascular. Estudos sugerem que a doença vascular no DM1 tenha como evento precursor a disfunção endotelial (DE). A hiperglicemia parece causar DE no DM1 através da geração do estresse oxidativo. O momento exato do surgimento da DE na história natural do DM1, assim como a influência do controle glicêmico de curto e longo prazo ainda não estão estabelecidos. **Objetivo:** O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a função endotelial através da Dilatação Arterial Mediada por Fluxo (DMF) em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo1. Os objetivos secundários foram analisar os fatores que possam estar envolvidos com a disfunção endotelial no DM1, como o tempo de diabetes, o controle glicêmico e a presença de complicações microvasculares, como a microalbuminúria.

**Métodos:** Estudo prospectivo transversal com 57 pacientes com DM1 e 10 indivíduos não diabéticos, consecutivamente alocados e comparados quanto à presença de DE, através da DMF, aferida pela dilatação da artéria braquial após hiperemia reativa (dilatação endotélio-dependente) e após dilatação mediada por uso de nitrato sublingual (dilatação endotélio-independente). Considerou-se como DE quando valores de DMF foram menores ou iguais a 8% em relação ao valor basal. Os pacientes foram orientados a fazer monitorização glicêmica capilar intensiva nos 30 dias que antecederam a avaliação vascular. No 30º dia, houve coleta de exames laboratoriais e a avaliação vascular foi realizada. Dados prospectivos e históricos de hemoglobina glicosilada (HbA1c), através da técnica de imunoturbidimetria (Cobas Integra 400; Roche), foram obtidos aos 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 24 meses anteriores ao teste para DMF. Os critérios de exclusão foram: tabagismo, hipertensão, obesidade, hipotireoidismo, uso de estatina, gestação, história de neoplasia ou doença vascular.

**Resultados:** Em 57 pacientes com DM1 estudados, 28 (49%) apresentaram DE. A média da dilatação endotélio-dependente foi significativamente menor nos pacientes com DM1, comparados aos indivíduos não-diabéticos ( $9,48 \pm 6,48\%$  vs.  $14,56 \pm 5,60\%$ ,  $p=0,02$ ). A dilatação endotélio-independente foi significativamente menor nos pacientes com DM1 em relação aos controles ( $22,26 \pm 9,2\%$  vs.  $29,31 \pm 4,2\%$ ,  $p=0,02$ , VR: acima de 8%), mas não houve diferença entre os DM1 com ou sem DE ( $p=0,72$ ). O tempo de DM1 (meses) foi maior nos pacientes com DE do que nos sem DE ( $105,4 \pm 74,7$  vs.  $66,3 \pm 48,0$ ,  $p=0,02$ ) e houve correlação linear negativa entre duração do DM e presença de DE ( $r=-0,28$ ,  $p=0,02$ ). A média da HbA1c (%) coletada no momento da avaliação vascular foi semelhante entre pacientes com DM1 com DE e sem DE ( $8,97\% \pm 1,85$  vs  $8,23\% \pm 1,45$ ,  $p=0,10$ ) e não houve correlação significativa

com a DMF ( $r=-0,128$   $p=0,34$ ). Todavia, quando as HbA1c históricas foram avaliadas, houve correlação significativa com a HbA1c aos 15 meses ( $r=-0,303$ ,  $p=0,02$ ) e no período de 12-24 meses anteriores ao exame vascular ( $r=-0,289$ ,  $p=0,03$ ), mas não com a HbA1c média de 0-12m ( $r=-0,181$   $p=0,18$ ). A DMF foi menor nos pacientes com microalbuminúria em relação aos normoalbuminúricos ( $4,83\pm 3,81\%$  vs  $10,35\pm 6,50\%$ ,  $p=0,015$ ). A microalbuminúria também foi mais prevalente nos DM1 com DE do que sem DE (22,2% vs 3,5%,  $p=0,04$ ). Considerando apenas os pacientes com DM1 com tempo de DM menor que 5 anos, 10/28 (35,7%) apresentaram DE. Com relação a dilatação não-dependente de endotélio (%), não houve diferença em relação aos controles ( $p=0,16$ ) e nem entre os DM1 com e sem DE ( $p=0,27$ ). A média da HbA1c na época do exame vascular também não foi diferente nos pacientes com e sem DE ( $8,20\pm 0,94\%$  vs.  $7,99\pm 1,37\%$ ,  $p=0,66$ ). As correlações de Pearson entre a DMF e as HbA1c históricas foram negativas aos 12 meses ( $r=-0,419$ ,  $p=0,03$ ), aos 15 meses ( $r=-0,437$ ,  $p=0,03$ ) e com a HbA1c média de 12-24 meses ( $r=-0,426$ ,  $p=0,027$ ).

**Conclusões:** Pacientes com DM1 apresentam prejuízo na função endotelial, quando comparados a controles não diabéticos. A DE é um evento precoce na história natural do DM1, e está presente nos pacientes antes dos 5 anos de doença, estando associada, ao tempo de DM1, à presença de microalbuminúria e ao controle metabólico de longo-prazo. A ausência de disfunção de músculo liso endotelial no grupo com menos de 5 anos de DM, com valores de dilatação não-endotélio-dependente semelhantes aos controles, sugere ser a DE um fenômeno ainda reversível nos primeiros anos de doença.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus tipo1, Disfunção Endotelial, Controle Glicêmico

## ABSTRACT

### Endothelial Dysfunction Occurs in Type 1 Diabetes Adolescents Under 5 Years of Disease and is Associated to Microalbuminuria and Long-Term Glycemic Control

GISLAINE VISSOKY CÉ, ANTÔNIO MARCOS VARGAS DA SILVA, MÁRCIA K C PUÑALES, ANDRÉA CAUDURO DE CASTRO, LUIS EDUARDO ROHDE, MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

Patients with Type 1 diabetes (T1DM) are at high-risk for developing micro and macrovascular complications. Endothelial dysfunction (ED) has been suggested to be a precursor of both complications in Type 1 diabetes. Hyperglycemia may be associated to ED through generation of oxidative stress. The exactly moment when ED occurs in T1DM is until not well established. Also we do not know if long-term rather than short term metabolic control have a greater impact in ED.

**Objective:** The aim of this study was to assess endothelial function by Flow Mediated Dilation (FMD) in (T1DM) patients and compare with non- diabetic controls. Secondary objectives were to analyze factors that could be associated to ED: duration of T1DM, glycemic control and microvascular complications like microalbuminuria.

**Research design and methods:** In a cross-sectional study 57 adolescents with T1DM and 10 non-diabetic controls, were recruited and compared for the presence of ED by FMD with evaluation of reactive hyperemia (endothelium-dependent dilatation) and after using sublingual nitrate spray for assessed non-endothelial-dependent dilatation. ED was considered when  $FMD \leq 8\%$  in relation to basal value. Patients performed intensive self monitoring blood glucose for 30 days before vascular studies. At day 30, blood was drawn for biochemical determinations and endothelial function was carried out. Historical data from Glycated hemoglobin (HbA1c), determined by immunoturbidimetry (Cobas Integra 400; Roche) were collected at 3, 6, 9,12,15,18 and 24 months before the test for FMD. Excluding criteria were any time tobacco use, clinical hypertension, obesity, hypothyroidism, statin use, current pregnancy and any history of previous neoplasia or vascular disease.

**Results:** Of 57 T1DM patients studied, 28 (49%) presented ED. FMD was significantly decreased in T1DM compared to controls ( $9.48 \pm 6.48\%$  vs.  $14.56 \pm 5.60\%$ ,  $p=0.02$ ). Nitrate-mediated dilation (%) was decreased in T1DM compared to controls ( $22.26 \pm 9.2\%$  vs.  $29.31 \pm 4.2\%$ ,  $p=0.02$ ,  $RV = >8\%$ ), but it was not different between T1DM with or without ED ( $p=0.72$ ). The duration of T1DM was longer in ED vs. Non-ED patients:  $105.4 \pm 74.7$  vs.  $66.3 \pm 48.0$  months,  $p=0.02$  and presented negative linear correlation between duration of T1DM and FMD ( $r=-0.284$ ,  $p=0.03$ ). HbA1c at the moment of the vascular analysis did not differ between ED and Non-ED patients ( $8.97 \pm 1.85\%$  vs.  $8.23 \pm 1.44\%$ ,  $p=0.10$ ) and it was not associated with FMD ( $r=-0.128$ ,  $p=0.34$ ). However, we found significant negative correlation between HbA1c and FMD at 15 months ( $r=-0.303$ ,  $p=0.02$ ) and at 12-24 months before vascular study, but not with median HbA1c of 0-12m ( $r=-0.181$ ,  $p=0.8$ ). Microalbuminuria was more prevalent in T1DM patients with ED than Non-ED (22.2% vs. 3.5%,  $p=0.04$ ). FMD was decreased in microalbuminuric compared to normoalbuminuric patients ( $4.83 \pm 3.81\%$  vs  $10.35 \pm 6.50\%$ ,  $p=0.015$ ).

In T1DM patients with less than 5 years of disease, 10 of 28 (35.7%) presented ED. Nitrate-mediated dilation, in this group, was not decreased compared to controls ( $p=0.16$ ) and it was not different in T1DM patients with or without ED ( $p=0.27$ ). HbA1c at the moment of vascular analysis did not significantly differ in ED compared to Non-ED patients ( $8.20\pm 0.94\%$  vs.  $7.99\pm 1.37\%$ ,  $p=0.66$ ). Pearson's correlation between FMD and historical HbA1c was negative with HbA1c at 12 ( $r=-0.419$ ,  $p=0.03$ ), at 15 ( $r=-0.437$ ,  $p=0.03$ ) and 12-24 months before vascular analysis ( $r=-0.426$ ,  $p=0.02$ ).

**Conclusions:** Endothelial function is impaired in T1DM patients compared to non-diabetic controls. ED is a phenomenon that can occur quite early in the natural history of T1DM, presented before 5 years of disease and is related to duration of disease, long-term metabolic control and microalbuminuria. Vascular smooth muscle was not impaired in T1DM patients with less than 5 years of disease, with values of non-endothelial-dependent dilation similar to controls, suggesting that ED can be a reversible event in this first years of disease.

**Key words:** Type 1 Diabetes, Endothelial Dysfunction, Glycemic Control



---

---

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo1 (DM1) está associado à incidência aumentada de doença micro e macrovascular (1). Os indivíduos com DM1 apresentam um risco de 3-6 vezes de morte por doença cardiovascular abaixo dos sessenta anos de idade, se comparados a não diabéticos (2). A doença vascular precoce e acelerada no DM1 pode ser atribuída, em parte, à presença de fatores de risco clássicos de doença cardiovascular, como hipertensão e dislipidemia, estes, entretanto, não explicam completamente esse risco aumentado de comprometimento vascular (2, 3).

A hiperglicemia exerce papel importante no desenvolvimento da macroangiopatia no DM1 (4). O aumento da glicemia, principalmente pós prandial, parece causar disfunção do endotélio vascular no DM1, através da geração do estresse oxidativo (5). Indivíduos com DM1 apresentam atividade inflamatória aumentada, demonstrada pelos níveis aumentados de proteína C reativa (PCR) (6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (7). A elevação destes marcadores inflamatórios parece estar relacionada à hiperglicemia e à formação de produtos avançados da glicação protéica (AGEs) (8). Inflamação e disfunção endotelial (DE) estão interrelacionadas, uma contribuindo para o aparecimento da outra, sendo responsáveis pelo comprometimento cardiovascular no DM1 (9, 10).

Estudos sugerem que a doença vascular no DM1 tenha como evento precursor a DE (11) e esteja associada com alterações estruturais ateroscleróticas precoces, como espessamento das camadas íntima e média carotídeas (EIMC) (12).

O exato momento na história natural do Diabetes Mellitus (DM) que a DE surge não é conhecido, entretanto, existem evidências que ocorra já na primeira

década de diagnóstico do DM1 (11, 12). A DE reflete a presença de um fenótipo propenso à aterogênese e pode, dessa forma, servir de marcador de risco para aterosclerose, já tendo sido demonstrada como fator de risco independente para eventos cardiovasculares (13).

Os objetivos deste estudo foram avaliar a função endotelial nos primeiros anos de diagnóstico do DM1 e estudar a associação com o tempo de DM1, controle glicêmico e presença de microalbuminúria.

---

***REVISÃO DA LITERATURA***

---

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### 2.1 Diabetes Mellitus tipo 1

#### **2.1.1 Definição**

O DM é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia secundária a distúrbios na secreção e/ou ação da insulina (14, 15). O DM1 caracteriza-se pela deficiência total da secreção de insulina, resultante da destruição das células-beta pancreáticas por processo auto-imune e é responsável por 5 a 10% das formas de diabetes (14-17). O DM1 é a forma mais freqüente de diabetes na infância e adolescência e a sua incidência vem aumentando rapidamente, afetando cada vez mais crianças e adolescentes em idades mais precoces, provavelmente em virtude do aparecimento de novos fatores ambientais agressores (18).

#### **2.1.2. Epidemiologia**

Segundo dados da *International Diabetes Federation de 2007*, estima-se que existam 440.000 crianças com DM1 de uma população mundial de 1,8 bilhões de crianças com idades entre 0-14 anos (prevalência de 0,02%), e que, a cada ano, 70.000 novos casos de DM1 sejam diagnosticados (incidência anual de 3%) (19). Quanto ao panorama mundial, a incidência de DM1 varia de 0,1/100.000 por ano na China e Venezuela a 42 e 53,9/100.000 por ano na Finlândia e Sardenha (20-23) (24). Os estudos epidemiológicos de incidência de DM1 são escassos no Brasil. Estima-se que existam 5-8 milhões de brasileiros com diabetes, sendo que 10% correspondam ao tipo 1 (25). Em um estudo realizado em Londrina, no Paraná, a taxa de incidência foi de 12,7/100.000 enquanto, em outro estudo, no estado de São Paulo, envolvendo três cidades, a incidência encontrada foi de 7,6/100.000 em

jovens abaixo de 15 anos (26, 27). No Estado do Rio Grande do Sul, existe uma estimativa de aproximadamente 8.000 crianças e adolescentes (0 a 20 anos) com DM1 e que sejam diagnosticados, anualmente, 312 novos casos. Na cidade de Passo Fundo, a incidência encontrada foi de 12,0/100.000 nessa faixa etária (28). Em Porto Alegre, no Instituto da Criança com Diabetes, são atendidas, atualmente, 1700 crianças e adolescentes com DM1 e são registrados, aproximadamente 100 novos casos ao ano.

### **2.1.3 Sub-Classificação do Diabetes Mellitus tipo 1**

O DM1, atualmente, é classificado em dois subtipos: um auto-imune (DM1 A) e outro não auto-imune (DM1 B). O DM1 B corresponde a 4-7% dos casos e está provavelmente relacionado a mutações do gene da insulina (29). Este pode incluir formas não clássicas como o diabetes fulminante (30) e o DATC (Diabetes do Adulto com Tendência à Cetose) (31). Já o DM1 A pode estar associado a outras doenças auto-imunes como a Doença Celíaca, a Doença de Addison e a doenças tireoidianas como a Tireoidite de Hashimoto e a Doença de Graves. Ainda, a associação de DM1 A e sinais de resistência à insulina tem sido denominada de Diabetes Duplo (DD), tipo 1 e tipo 2.

### **2.1.4 Etiopatogenia do Diabetes Mellitus tipo 1**

O DM1 tem como característica uma total deficiência de insulina que resulta da destruição seletiva da célula-beta pelo sistema imune. O desencadeamento desta auto-imunidade contra a célula beta é causado, provavelmente por agentes ambientais que atuam quando existe uma predisposição genética (32). Foram descritos mais de vinte *loci* que conferem suscetibilidade ao DM1, estando os mais importantes localizados nos cromossomos 1,2,6,11 (33, 34). A região do sistema

antígeno leucocitário humano (HLA), localizada no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), situa-se no braço curto do cromossomo 6 e constitui o principal locus de suscetibilidade para DM 1. Cerca de 30% da população geral apresenta algum grau de predisposição genética, mas apenas 0,5% evolui para o DM1 A (35).

Vários agentes etiológicos foram apontados como desencadeantes da auto-imunidade: vírus Coxsackie e da Rubéola; toxinas (pesticidas, nitratos); deficiência na suplementação de vitamina D e a introdução precoce de leite de vaca ou tardia e abrupta de cereais (36). Uma vez ativadas, células imunes (linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas) invadem as ilhotas, causando insulite, com liberação de citocinas (Interleucina 1, Interferon e TNF- $\alpha$ ), provocando prejuízo funcional e por fim, apoptose das células-beta.

### **2.1.5 História natural do Diabetes Mellitus tipo 1**

O sinal mais precoce de auto-imunidade contra as células-beta, geralmente detectável meses ou anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos, é a presença de anticorpos circulantes contra antígenos das células beta (37). Esses anticorpos podem ser considerados marcadores de risco para o desenvolvimento do DM 1. Os principais auto-anticorpos presentes em indivíduos pré-diabéticos são os contra a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), anti-insulina (IAA), anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA) e anti-proteína de membrana com homologia às tirosino-fosfatases ou antígeno 2 do insulinoma (anti-IA-2).

Ao diagnóstico, restam apenas 10% das células-beta funcionantes e, com o tempo, estas se tornam ausentes. Os auto-anticorpos também tendem a desaparecer com a evolução da doença, à exceção do anti-GAD65.

### **2.1.6. Complicações crônicas do Diabetes:**

O DM está associado com risco aumentado de complicações vasculares severas que demandam tratamento por toda a vida. Sabe-se que 80% dos pacientes com DM1 que desenvolveram microalbuminúria evoluirão para a nefropatia clínica em um período de 6-14 anos e 75%, em 20 anos, mesmo com intervenções específicas. O DM é a principal causa de falência renal em pacientes, ingressando em programas de diálise (38). Ainda, o DM é a principal causa de cegueira em adultos de 24-74 anos, sendo a retinopatia diabética encontrada após 20 anos de DM1 em 90% dos casos. Além disso, o DM é responsável por 60% das amputações não traumáticas. Quanto a doença macrovascular, os indivíduos com DM adoecem 2-4 vezes mais de doenças cardíacas e isquemia cerebral que indivíduos não diabéticos (39).

A natureza crônica e a gravidade de suas complicações tornam o DM uma doença muito onerosa, não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde. Inúmeros indivíduos com DM tornam-se incapazes de continuar trabalhando em decorrência das complicações crônicas, ou ficam com alguma limitação no seu desempenho profissional. Os custos imensuráveis como a dor, ansiedade e perda de qualidade de vida também apresentam grande impacto na vida das pessoas com DM.

Estudos como o UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*) realizado em pacientes com DM2 e o DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) para o DM1 evidenciaram uma redução significativa das complicações micro vasculares do DM, como a retinopatia e nefropatia, através do controle metabólico intensivo (40, 41). No estudo DCCT/ EDICT (*Diabetes Control and Complications Trial / Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*), também o



tratamento intensivo comparado ao convencional, reduziu significativamente a incidência de doença cardiovascular no DM1 (4). O controle adequado e precoce dos níveis glicêmicos, da pressão arterial e dislipidemia, bem como a detecção precoce de alterações vasculares, tornam-se medidas importantes de prevenção de complicações do DM.

Estudos sugerem que a doença vascular no DM1 tenha como evento precursor a DE (11). No endotélio vascular do DM1 ocorrem alterações estruturais ateroscleróticas precoces, e a DE pode servir como marcador desse processo de dano vascular, para que sejam tomadas medidas de prevenção das complicações vasculares.

## 2.2 Disfunção Endotelial no Diabetes Mellitus tipo 1

### **2.2.1 O Endotélio Normal**

O endotélio vascular é composto de uma mono-camada de epitélio pavimentoso que recobre todos os vasos do organismo, como as artérias, as veias, os capilares e os linfáticos. Este se localiza entre o sangue circulante e a camada de músculo liso vascular. Esta localização estratégica permite que regule o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular, a homeostase, a resposta imune e o processo proliferativo fibroinflamatório local. A membrana luminal da célula endotelial está em contato direto com os componentes e constituintes do sangue, logo é considerada o sensor da célula endotelial, capaz de detectar variações de pressão e de fluxo sanguíneo e alterações metabólicas que possam ocorrer em qualquer local do organismo.

O endotélio vascular pode ser considerado, por isso, um órgão endócrino que, em resposta a estímulos humorais, mecânicos e neurais, sintetiza e libera substâncias vasoativas, denominadas fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). Dentre os fatores relaxantes, podemos citar como os principais o óxido nítrico (NO), a prostaciclina, a bradicinina, a histamina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (42). Já os vasoconstritores são: a angiotensina II, a endotelina, a serotonina, o ácido araquidônico, a prostaglandina H<sub>2</sub>, os produtos da ciclooxygenase, como endoperóxidos e tromboxano e as espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (43).

As EROs também podem estimular a proliferação celular e aumentar o efeito proliferativo e vasoconstritor da angiotensina II, através da inativação do NO. A principal defesa do organismo contra as EROs são as enzimas também produzidas pelo endotélio: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase e catalases,. A defesa antioxidante inativa as EROs no meio intracelular para a preservação endotelial (44).

Além dessas substâncias, o endotélio vascular pode produzir os fatores de crescimento das células do músculo liso vascular, como o fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (*I-likeGF*), que juntamente com a endotelina, angiotensina II e o ânion superóxido promovem proliferação celular.

Durante um processo inflamatório vascular, moléculas de adesão intercelular (ICAM), moléculas de adesão de células vasculares (VCAM) e moléculas de adesão endotelial de leucócitos (ELAM) podem ser liberadas pelo endotélio com o intuito de

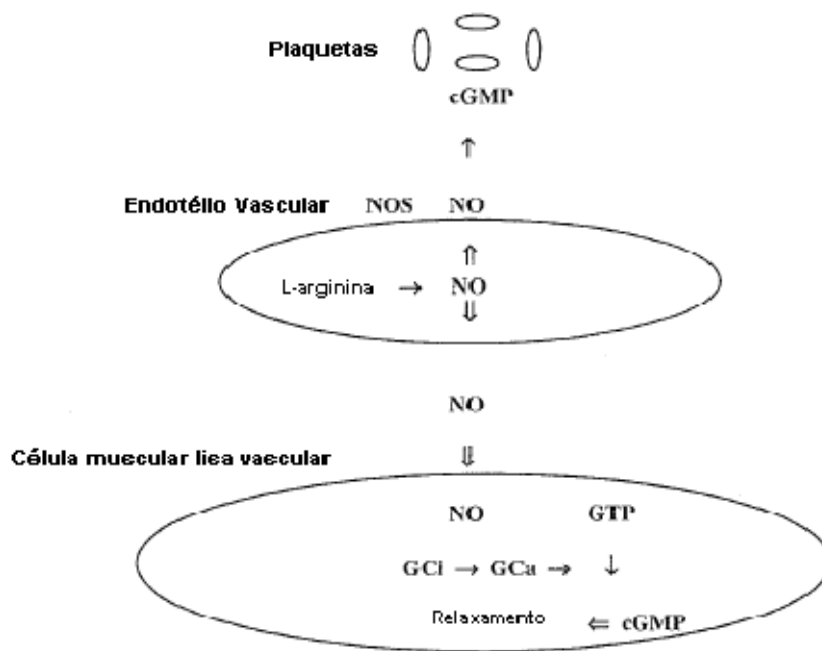
evitar a ruptura do mesmo. Estas regulam a migração de linfócitos, monócitos, leucócitos durante uma ativação imunológica e são moduladas pelo NO.

Agentes trombolíticos como o fator tecidual ativador do plasminogênio, o ativador do inibidor do plasminogênio I , a trombomodulina, interleucinas e o Fator de Von Willebrand (vWf). são liberados pelo endotélio vascular e regulam a formação do trombo intravascular. O endotélio vascular, portanto, com todas essas propriedades inibe a aterogênese e protege os vasos sanguíneos.

### **2.2.2 O óxido nítrico**

O NO é o principal mediador das atividades exercidas pelo endotélio. Este é considerado um radical livre (apresenta um elétron desemparelhado na última camada) que se apresenta em estado gasoso, sendo facilmente difusível entre as membranas celulares, o que lhe confere uma capacidade de reagir com outros radicais livres ou com o oxigênio molecular.

A produção de NO ocorre na célula edotelial com auxílio de co-fatores como a tetra-hidro-biopterina (BH4), a nicotinamida adenosina difosfato (NADPH) e a enzima óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS). Esta catalisa a oxidação do nitrogênio guanido-terminal da L-arginina, resultando na produção do NO e do subproduto L-citrulina. Rapidamente, o NO se difunde do endotélio para a camada de células musculares lisas e plaquetas, onde ativa a enzima guanilato-ciclase (GCa) com conseqüente produção de GMP cíclico (GMPc). A presença do GMPc promove relaxamento vascular e inibição da agregação plaquetária (45) , Figura 1. A meia-vida do NO é de apenas alguns segundos, sendo rapidamente oxidado a nitrato antes de ser excretado na urina (46).



**Figura 1: Síntese e liberação de NO no endotélio vascular**  
 Adaptado de Chan NN et al (45).

O mecanismo clássico de ativação da e-NOS é o aumento da concentração de cálcio intracelular. Este se liga à calmodulina, que efetua o acoplamento do transporte de elétrons para produção de NO. Já a ativação tônica ou fásica da e-NOS, em resposta ao fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais (estresse de cisalhamento), é o principal mecanismo fisiológico de liberação do NO e pode acontecer na ausência de alteração da concentração do cálcio citosólico, através da fosforilação do aminoácido serina pela enzima Akt quinase (proteína quinase B) que, por sua vez, é fosforilada pela quinase lipídica PI-3 (fosfatidil-inositol 3 quinase) (47). O terceiro mecanismo de ativação das e-NOS envolvido na proliferação e maturação das células vasculares é a via de esfingolípides, que atuam em interação com a Akt quinase (48).

Outros estímulos para liberação fisiológica do NO incluem: estiramento pulsátil da parede do vaso e baixa tensão de oxigênio arterial (49, 50) (45,46). A

liberação fisiológica do NO pode ser bloqueada pela Ng-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), um específico inibidor da e-NOS (51).

### **2.2.3 Disfunção Endotelial**

A disfunção endotelial (DE) é definida pela perda das propriedades do endotélio citadas anteriormente. Os principais determinantes são: a diminuição da disponibilidade de NO e a preponderância de fatores vasoconstritores liberados pelo endotélio, em detrimento aos fatores vasodilatadores (52). A DE gera, portanto, alteração no perfil anti-aterogênico, promovendo migração e proliferação de células musculares lisas, agregação plaquetária, oxidação do LDL, adesão de monócitos e plaquetas e síntese de citocinas inflamatórias, contribuindo para aterogênese (53).

Alterações na morfologia vascular no diabetes (DM) têm sido relatadas tanto em estudos experimentais como em estudos clínicos. Em aorta de coelhos com DM induzido por aloxana, alterações endoteliais são visíveis 2 semanas após o início do diabetes e se tornam mais severas após 6 semanas do início da hiperglicemia (54). Estas incluem a adesão de leucócitos, plaquetas e material fibrinoso na superfície endotelial. Em ratos, após 6 semanas do início do diabetes induzido pela estreptozotocina (STZ), também se observa alterações como o aumento da permeabilidade endotelial e apoptose celular endotelial (55).

Em estudos clínicos clássicos, o achado encontrado mais importante é o espessamento da membrana basal, observado, através de microscopia eletrônica, em capilares da pele de pacientes com DM1 comparado a indivíduos não-diabéticos (56). Esta alteração parece ser reversível, uma vez que o controle glicêmico intensivo, durante um ano, é capaz de reduzir a espessura da membrana basal em capilares musculares de pacientes com DM1 (57). Estudos em células endoteliais

obtidas de cordão umbilical de gestantes com DM1 comparadas a gestantes sem diabetes, mostraram aumento da área mitocondrial (58). O significado clínico destas alterações não é claro, porém podem contribuir para a instalação e progressão da doença aterosclerótica precoce no DM1.

Vários investigadores já demonstraram a disfunção vasomotora em modelos experimentais (59, 60) e em estudos clínicos, tanto no DM1 (61-63)57,58) como no Diabetes Melito tipo 2 (DM2) (64-66).

No DM pode ocorrer o desacoplamento da e-NOS, uma situação em que a transferência de elétrons, durante a catálise enzimática da síntese de NO, não se completa adequadamente. Os elétrons “vazam” (são liberados pelo NADPH) e são captados pelo oxigênio molecular, gerando radicais livres, como o superóxido. A NOS desacoplada não apenas priva o ambiente celular da síntese e NO, como também produz o principal antagonista do NO, o radical superóxido, propiciando uma situação ideal para a geração do intermediário tóxico peroxinitrito. O desacoplamento do eNOS é, portanto, um importante mecanismo inicial de DE no DM (67).

A função endotelial no DM1 parece ser modulada pelo grau de hiperglicemia aguda (68), pela duração do diabetes (11, 69, 70), pelas concentrações séricas de insulina (71, 72) e pela presença de complicações crônicas, especialmente a neuropatia autonômica (73) e a microalbuminúria (74, 75).

#### **2.2.4 Métodos de avaliação da função endotelial:**

A função endotelial pode ser investigada de forma invasiva ou não-invasiva, por várias técnicas, em diferentes leitos vasculares e por diversos estímulos farmacológicos ou mecânicos.

Em pacientes submetidos à cineangiocoronariografia diagnóstica, a utilização de ultra-som *doppler* intra-coronário para a medida do fluxo coronário, permite avaliar a vasodilatação coronária antes e após a injeção intra-coronária de acetilcolina e bradicinina (vasodilatadores dependentes do endotélio) e a hiperemia reativa (aumento de fluxo após um período de isquemia) (76). Os pacientes com doenças coronárias ou portadores de DM, hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou tabagistas possuem resposta vasodilatadora reduzida ou até mesmo vasoconstritora. Esta abordagem invasiva pode contribuir para o entendimento dos efeitos das diversas drogas usadas para o tratamento da aterosclerose coronária sobre a função endotelial, além de demonstrar que o grau de DE apresenta correlação com risco de eventos coronários adversos futuros (77).

No entanto, a utilização de técnicas invasivas, envolvendo a canulação de uma artéria e a infusão de drogas vasoativas podem tornar-se inviáveis na prática clínica. Assim, as técnicas que envolvem procedimentos não-invasivos ou com infusões de drogas a baixas concentrações e com efeitos somente em pequenos segmentos vêm sendo cada vez mais utilizadas. As principais técnicas são: Dilatação Arterial Mediada por Fluxo (DMF) (78), Tonometria de artéria periférica (79), Fluxometria com laser Doppler (80), *Dorsal Hand Vein* (81) e Pletismografia de oclusão venosa (82).

A avaliação da função endotelial de forma não-invasiva pode ser feita através da captação de imagens da artéria braquial por ultrassonografia de alta resolução (83). A técnica mais comumente utilizada envolve a hiperemia reativa e o estresse de cisalhamento os quais são os estímulos para a ocorrência da DMF, ou seja, a vasodilatação dependente do endotélio (78).

A hiperemia reativa ocorre após um período de isquemia induzido por oclusão da artéria braquial com um manguito aneróide insuflado, onde há liberação progressiva de mediadores vasodilatadores como a adenosina, íons H<sup>+</sup>, EDHF entre outros pelo tecido isquêmico. Ao ocorrer à liberação do fluxo arterial, ocorre a hiperemia reativa, com o fluxo sanguíneo aumentando 100% a 300% superior ao fluxo basal e, conseqüentemente, promovendo *shear stress na parede arterial*. As células endoteliais, por sua vez, ativam os canais de potássio que levam a hiperpolarização do endotélio com aumento da entrada de cálcio intracelular. Este ativa a e-NOS, liberando NO e promovendo relaxamento do músculo liso vascular subjacente, com aumento do diâmetro arterial (84). Este mecanismo de dilatação arterial mediada por fluxo depende da presença do NO e da integridade funcional do endotélio.

O procedimento técnico consiste na medida do diâmetro longitudinal da artéria braquial na condição basal, seguida pela oclusão da artéria durante 5 min e medida do diâmetro arterial após 45 e 60 segundos da liberação da oclusão (78). O dado obtido é o percentual de dilatação após a hiperemia reativa em relação ao basal. Considera-se disfunção endotelial quando o aumento da dilatação é inferior a 8,1% (85). Alguns autores consideram como DE um valor de dilatação arterial inferior a 10% (86).

#### Avaliação de disfunção de músculo liso vascular

Para verificar a presença de disfunção do músculo liso vascular, é necessário avaliar a vasodilatação independente do endotélio. Após 10 a 20 minutos de repouso para o restabelecimento das condições iniciais pós hiperemia reativa, realizam-se novas medidas basais, e administra-se um *spray* de nitroglicerina sublingual (0,3-0,5mg). Após 4 min, mede-se o diâmetro da artéria. Esta diferença representa a



vasodilatação independente do endotélio, ou seja, mediada pelo músculo liso vascular, e considera-se normal uma dilatação acima de 8% em relação ao basal (85).

Outra técnica que vem sendo cada vez mais utilizada é a medida da espessura da camada íntima-média da carótida comum (EIMC) por ultrassonografia, a qual representa um marcador estrutural de aterosclerose e se correlaciona inversamente com a FMD na artéria braquial (13). Estudos recentes demonstraram que crianças com DM1 já apresentam nos primeiros anos de doença EIMC em relação a controles saudáveis (87, 88).

### 2.3. Mecanismos de Disfunção Endotelial no Diabetes tipo 1

Os mecanismos pelos quais o DM1 está associado à DE são complexos e não completamente compreendidos. Embora, a presença de fatores de risco como hipertensão e dislipidemia possa contribuir diretamente para a DE, a combinação de diversos mecanismos relacionados ao aumento dos níveis glicêmicos são determinantes para o desenvolvimento desta alteração.

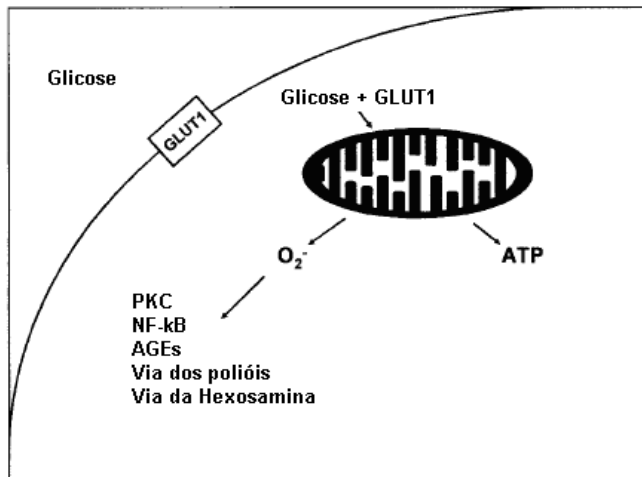
#### **2.3.1 O estresse oxidativo**

O estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos de defesa vasculares são esgotados pelo excesso de produção de radicais livres ou quando tais mecanismos não estão eficientes para combater o efeito desses. Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo seja a chave-mestra na patogênese das complicações micro e macrovasculares nos indivíduos com DM e que, a disfunção endotelial seja um marcador precoce do processo de agressão (89, 90). No entanto, o papel do

estresse oxidativo no DM é questionado por alguns autores pelos resultados obtidos com estudos de intervenção com anti-oxidantes (87).

Já foi demonstrado que em células endoteliais da aorta humana, a exposição prolongada a altas concentrações de glicose aumenta a expressão gênica da e-NOS e a liberação de NO (91). No entanto, ocorre aumento concomitante do radical superóxido, que é um potente oxidante. O ânion superóxido pode ser gerado, na célula endotelial através da angiotensina II, do LDL oxidado, da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e das oxidases vasculares, como a NADPH oxidase (92). O ânion superóxido liga-se ao NO, prejudicando a sua ação no endotélio (93).

Nas células endoteliais, a glicose pode atravessar livremente a membrana basal via um transportador de glicose não dependente de insulina denominado Facilitador do transporte de glicose 1 (GLUT1). A hiperglicemia intracelular provoca superprodução de superóxido a nível mitocondrial, levando à ativação de outras vias metabólicas (94) (Figura 2).

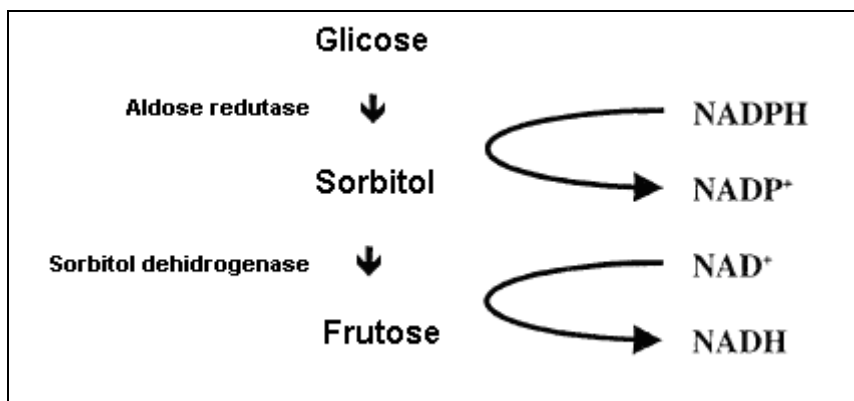


**Figura 2: Superprodução de superóxido na mitocôndria e ativação de vias alternativas de metabolismo da glicose**

Adaptado de Ceriello A (94).

### 2.3.2 Ativação da via dos polióis

A hiperglicemia crônica leva à ativação da via dos polióis pela enzima aldose redutase, com transformação da glicose em sorbitol e subseqüentemente em frutose, promovendo consumo de NADPH, co-fator importante para síntese de NO (95, 96), Figura 3.



**Figura 3: A via dos polióis**  
 Adaptado de Chan NN et al (45).

### 2.3.3. Ativação da proteína c quinase

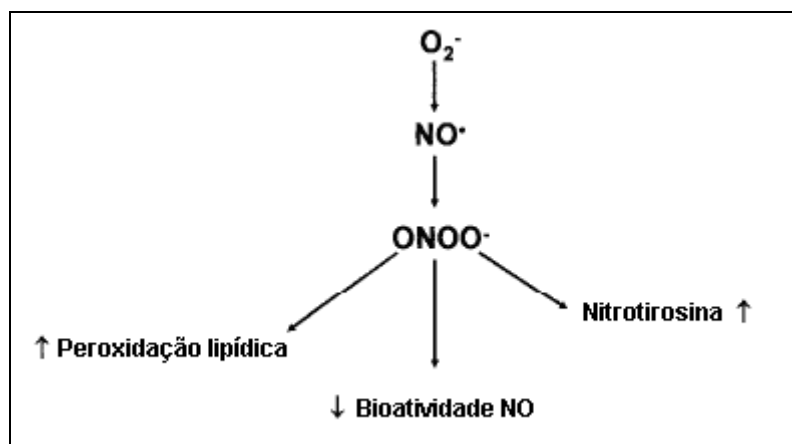
A ativação da proteína quinase C (PKC) pelo aumento de diacil-glicerol, induzido pela hiperglicemia, também tem sido sugerido como mecanismo para DE e alterações vasculares relacionadas ao DM como aumento da permeabilidade vascular, de citocinas, contratilidade e proliferação celular (97).

### 2.3.4. Formação de produtos finais de glicação avançada

Na presença de hiperglicemia sustentada, proteínas teciduais como o colágeno da parede arterial e proteínas da membrana basal sofrem glicação não enzimática, resultando na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (98). Estes provavelmente promovem DE e complicações vasculares no DM por modificações químicas permanentes em células e proteínas e, indiretamente, estimulando respostas celulares por receptores específicos (99). O acúmulo de AGEs com o tempo parece reduzir a disponibilidade do NO, uma vez que os intermediários reativos formados na via de glicação podem fixar o NO e

comprometer seu efeito anti-proliferativo. A produção aumentada de superóxido ativa a proteína quinase C, que por sua vez induz a síntese da enzima NADPH oxidase, que também contribui para produção de superóxido (100, 101).

A hiperglicemia também favorece, através da ativação do fator de transcrição celular que regula a resposta inflamatória (NF- $\kappa$ B), um aumento da expressão da eNOS com geração de NO (100). A superprodução de superóxido e de NO favorece a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um ativador da catalase da ciclooxigenase, da peroxidação lipídica e da produção de prostanóides (94), Figura 4. Este, além de apresentar ação citotóxica, interfere no cofator para produção de NO, tetrahydrobiopterina, promovendo também produção de superóxido, ao invés de NO (100).



**Figura 4: Formação de peroxinitrito através da superprodução de NO e superóxido**  
Adaptado de Ceriello A (94).

Concluindo, a produção de superóxido nas células endoteliais a nível mitocondrial, devido à hiperglicemia, está implicada na DE e na gênese das complicações do DM (5).

### **2.3.5 O tempo de Diabetes tipo1 e a função endotelial**

O tempo de DM é um determinante importante para a presença de DE no DM1. Em pacientes com mais de 10 anos de doença é um achado relativamente comum (74, 102). Entre 5-10 anos de DM1, a DE ocorre ocasionalmente. No estudo de Sigh e cols, 31 adolescentes com 6,8 anos em média de DM1 e mau controle glicêmico (HbA1c média de 8,6%), comparados a não-diabéticos, apresentaram DE, entretanto, não houve diferença na dilatação endotélio-independente e nem aumento da EIMC. Houve também correlação inversa significativa da dilatação endotélio-dependente com o tempo de DM ( $r=-0,39$ ,  $p= 0,02$ ) (11).

A DE no DM1, entretanto, parece ocorrer mais precocemente, antes dos 5 anos de DM, inclusive podendo preceder a microalbuminúria (74).

Järvisalo e cols. compararam crianças com média de 11 anos de idade, com DM1 há 4 anos e com controle glicêmico inadequado (HbA1c 8,9%), a crianças sem DM e evidenciaram DE em 36% dos casos. A DMF mostrou-se significativamente alterada em relação aos controles ( $4,4\pm 3,4\%$  vs  $8,7\pm 3,6\%$   $p<0,001$ ). Neste estudo a EIMC foi maior no DM1 ( $0,58\pm 0,5$  vs  $0,54\pm 0,04$  mm,  $p=0,01$ ) (12). Os autores concluíram que a DE pode existir nos primeiros 5 anos de DM1 e pode ser um importante preditor de aterosclerose prematura nesses pacientes.

Por outro lado, Ladeia e cols. avaliaram adolescentes com 3 anos de DM1, com HbA1c média de 9,35% e não encontraram diferença na DMF entre DM1 e controles  $10,9\pm 2$  vs  $11,2 \pm 2,4\%$ ,  $p=0,34$ , respectivamente (75).

### **2.3.6 O controle glicêmico recente e histórico na função endotelial**

Sabe-se que a hiperglicemia aguda e, principalmente a oscilação glicêmica, podem ser tão deletérias para o endotélio quanto a hiperglicemia sustentada. Ambas

levam às complicações micro e macrovasculares do DM, através da excessiva glicação de proteínas e da ativação do estresse oxidativo (103).

A hiperglicemia aguda pode causar atenuação da DMF mesmo em indivíduos sem DM (68), mas esse fenômeno parece ser reversível. Em um estudo realizado após sobrecarga oral de glicose (75g) em indivíduos com tolerância normal à glicose, com pré-diabetes e com DM2 a hiperglicemia aguda causou prejuízo na DMF em todos os grupos (DMF em jejum:  $7,53 \pm 0,40\%$ ;  $6,50 \pm 0,48\%$ ;  $4,77 \pm 0,37\%$ , respectivamente, e após sobrecarga oral de glicose:  $6,35 \pm 0,40\%$ ;  $4,00 \pm 0,47\%$ ;  $1,29 \pm 0,29\%$ , respectivamente,  $p < 0,005$ ). Os autores concluíram que este fenômeno, ocorrendo de maneira sustentada estaria implicado com a DE no DM (104).

Sorensen estudou o impacto da deteriorização aguda do controle metabólico na função endotelial em indivíduos com DM1 normoalbuminúricos. Os pacientes foram avaliados através da DMF e marcadores sorológicos de função endotelial após 48 horas de bom ou mau controle metabólico (redução das doses de insulina em 20-30% e liberação de dieta). A média da glicemia plasmática foi de 113,4 mg/dl vs 286,2 mg/dl para bom e mau controle glicêmico, respectivamente. Houve piora significativa da DMF ( $102,7\%$  vs  $104,0\%$ ,  $p < 0,05$ ) e da dilatação pós nitrato ( $114,5\%$  vs  $120,2\%$ ,  $p < 0,05$ ) e aumento do vWf após a deteriorização do controle glicêmico (105).

O efeito da hiperglicemia pós prandial na função endotelial tem sido pouco estudado no DM1. Ceriello e cols. estudaram o impacto da glicemia e da hipertrigliceridemia pós prandiais na função endotelial no DM2 e observaram que marcadores sorológicos de DE como a concentração sérica de moléculas de adesão ICAM-1, E-selectina, VCAM-1 e marcadores do estresse oxidativo, como a nitrosamina, aumentavam agudamente após a ingestão de 75 gramas de glicose

oral. Este efeito era ainda maior, quando adicionava-se a sobrecarga lipídica e seria mediado pelo estresse oxidativo (106). A hiperglicemia aguda no DM1, principalmente pós prandial, poderia também ser um mecanismo importante de DE.

A associação entre o valor da HbA1c, que representa a média das glicemias de 2 a 3 meses, e a DMF mostra-se bastante heterogênea nos diferentes estudos. No estudo de Lekakis e cols, os indivíduos com DM1 sem microalbuminúria e com HbA1c maior que 6% apresentaram menor DMF em comparação com os que apresentavam HbA1c menor que 6% (102). No estudo de Kadono e cols, os pacientes com DM1 e HbA1c menor que 7% tinham valores de DMF melhores do que os com HbA1c maior que 7% ( $11,4 \pm 8,7\%$  vs  $4,8 \pm 8,1\%$ ,  $p < 0,05$ ) (107). No estudo de Ladeia e cols em pacientes com DM1 há menos de 5 anos, normo e microalbuminúricos, houve correlação inversa positiva da DMF com HbA1c ( $r=0,53$ ,  $p=0,002$ ) (75). Já no estudo de Dogra e cols, que comparou a DMF em controles não diabéticos a indivíduos com DM1, em situação de normoglicemia, utilizando clamp euglicêmico de insulina para o DM, não houve correlação significativa entre HbA1c e DMF (74). Em todos esses estudos, entretanto, houve análise apenas da HbA1c coletada no momento do estudo, não sendo avaliadas as HbA1c históricas dos meses ou anos anteriores.

O conceito de memória metabólica em que o ambiente glicêmico no início do DM é relembrado em órgãos alvos como olhos, rins, coração e extremidades iniciou com estudos em animais. Kern estudou a retina de cachorros diabéticos, durante o período de 5 anos, em que um grupo manteve 2,5 anos de mau controle glicêmico e outro grupo iniciou com bom controle a partir de 2 meses do início do estudo e verificou que aqueles que tinham iniciado precocemente bom controle tiveram pequena evidência de retinopatia, semelhante ao grupo com bom controle durante

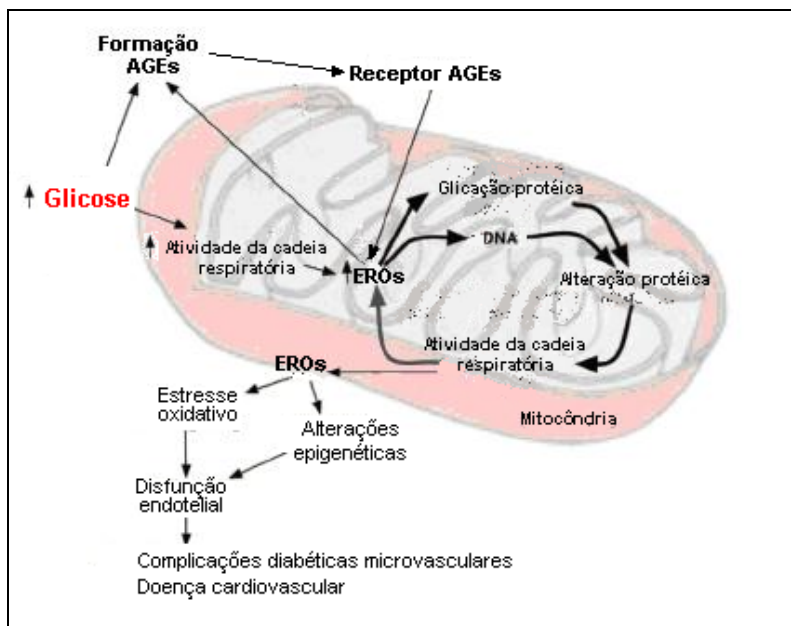


todo o estudo. Já, o grupo que iniciou com bom controle só a partir da metade do estudo teve similar incidência de retinopatia que o grupo com mau controle durante o 5 anos de acompanhamento (108).

O conceito de que a hiperglicemia sustentada, teria um efeito deletério que se perpetuaria por muitos anos e que, se o controle glicêmico adequado não iniciasse precocemente, este não seria suficiente para prevenir complicações futuras, clinicamente foi confirmado com os resultados de grandes estudos prospectivos. O DCCT (*The Diabetes Control and Complications Trial*) demonstrou os benefícios do tratamento intensivo do DM, reduzindo os valores glicêmicos e diminuindo a progressão das complicações microvasculares, se comparado ao tratamento convencional no DM1 (41). Durante o EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study) (109), mesmo a HbA1c não diferindo significativamente entre os grupos no final do estudo, houve um benefício importante no risco de desenvolver complicações daqueles indivíduos que tinham um melhor controle glicêmico no DCCT, sugerindo que o controle intensivo precoce do DM, provavelmente teve um impacto no risco a longo prazo de desenvolver complicações microvasculares.

Recentemente, em análise posterior ao EDIC, um estudo avaliou o risco de desenvolver retinopatia em pacientes com extremos de controle metabólico: HbA1c média  $\leq 6,87\%$  vs  $\geq 9,49\%$ , no início do DCCT. Naqueles com mau controle glicêmico, a retinopatia desenvolveu-se em 57% vs 9,8% no grupo com bom controle (110). No estudo de Nathan e cols, também os pacientes que tinham melhor controle metabólico no DCCT e foram seguidos no EDIC apresentaram menos complicações macrovasculares sob a forma de espessamento da íntima-média carotídea e doença cardiovascular (4, 67).

Segundo Ceriello, os mecanismos de propagação desta memória metabólica originariam-se da glicosilação de proteínas com formação de AGEs e lipídios a nível mitocondrial e na produção de EROs e do estresse oxidativo, em um ciclo vicioso que um contribuiria para a perpetuação do outro. A modificação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios pelas EROs poderiam exercer uma atividade celular alterada por muitos anos, independente dos níveis glicêmicos (111), Figura 4.



**Figura 5: O ciclo vicioso da memória metabólica**  
Adaptado de Ceriello A (111).

A redução da produção de radicais livres a nível mitocondrial das células endoteliais, entretanto, parece ser capaz de bloquear a memória metabólica (112). Em um estudo publicado por Ceriello em pacientes com DM, a DE persiste, mesmo após normalizada a glicemia. Mas, a combinação de um anti-oxidante (vitamina C) com a normalização glicêmica pode ser utilizada para interromper a DE (113).

## 2.4 Complicações microvasculares no Diabetes tipo1 e a disfunção endotelial

A doença aterosclerótica no DM1 está diretamente relacionada à presença de microangiopatia, principalmente a nefropatia diabética. Esta associação já pode existir nos estágios iniciais de nefropatia, como nos pacientes com microalbuminúria (74). A DE, como evento inicial no processo aterosclerótico, gera alterações na permeabilidade vascular, na coagulação e fibrinólise, que ocorrem também no endotélio vascular renal. Tanto a DE (13) como a microalbuminúria (114) constituem fatores de risco independentes de doença cardiovascular no DM1. Não se sabe ao certo se, a DE seria um evento ainda mais precoce do que a microalbuminúria no DM1, uma vez que pode ou não estar presente em pacientes normoalbuminúricos (74, 75).

No estudo de Dogra e cols, pacientes com 25 anos de DM1 e microalbuminúria, em condições de normoglicemia, foram comparados a pacientes sem microalbuminúria e a controles sem DM. A DMF estava comprometida nos DM1 em relação aos controles ( $3,2 \pm 0,3\%$  vs  $7,9 \pm 0,6\%$ ), e foi mais importante nos microalbuminúricos em relação aos normoalbuminúricos ( $3,2 \pm 0,3\%$  vs  $5,4 \pm 0,6\%$ ,  $p < 0,001$ ). Neste estudo, a albuminúria foi um preditor independente de DE (74).

No estudo de Ladeia e cols em crianças e adolescentes com menos de 5 anos de DM1 houve correlação negativa entre DM1 e microalbuminúria ( $r = -0,50$ ,  $p = 0,049$ ) (75).

Outro estudo que comparou a DMF e marcadores sorológicos de DE, em pacientes com DM1 em diferentes estágios de nefropatia diabética, evidenciou que

há relação importante da progressão da ND com o desenvolvimento de doença cardiovascular e que a DE seria um forte preditor (115).

Segundo Stehouver, a excreção urinária de albumina (EUA) em pacientes com DM1 não seria apenas um marcador de nefropatia diabética, mas também consequência da DE, devido ao aumento da permeabilidade dos vasos pelo dano endotelial (116).

Já em indivíduos com DM1 e normoalbuminúria, a associação com DE não é bem definida. Lekakis e cols. observaram comprometimento da DMF em indivíduos com DM1, com média de 13 anos de DM, normoalbuminúricos e com bom controle glicêmico (HbA1c 6,5%) em relação a controles sem DM ( $5,8 \pm 7,0\%$  vs  $11,0 \pm 7,0\%$   $p=0,01$ ) e a indivíduos com microalbuminúria ( $5,8 \pm 7,0\%$  vs  $0,75 \pm 2,55\%$ ,  $p=0,003$ ), sugerindo a DE ser um evento ainda mais precoce do que a microalbuminúria na história natural do DM1 (102).

No estudo de Enderle e cols em pacientes com DM1 há  $14,9 \pm 7,9$  anos, normoalbuminúricos, com HbA1c de  $7,9 \pm 1,2\%$ , a DMF, entretanto, não mostrou-se alterada em relação aos não-diabéticos ( $12,9 \pm 9,8\%$  vs  $17,3 \pm 9,9\%$ ,  $p=0,07$ ) (117).

Os estudos que avaliaram retinopatia diabética (RD) e DE são ainda mais escassos. Em um estudo que avaliou a associação de aterosclerose precoce e retinopatia não-proliferativa em 28 adolescentes com DM1, através da DMF, EIMC e níveis séricos de moléculas de adesão como: ICAM-1, VCAM-1 e e-selectina constatou que tanto os indivíduos com RD quanto os sem RD tinham valores de DMF menores que os controles ( $7,8 \pm 4,1\%$  vs  $12,1 \pm 5,1\%$ ,  $p=0,04$  e  $7,6 \pm 5,5\%$  vs  $12,1 \pm 5,1\%$ ,  $p=0,04$ ), respectivamente. Com relação a EIMC esta também mostrou-se aumentada nos DM1 em relação aos controles ( $0,49 \pm 0,06$  mm vs  $0,42 \pm 0,03$  mm,  $p=0,001$ ) e nos DM1 com RD em comparação aos sem RD ( $0,56 \pm 0,06$  mm vs

0,47±0,03 mm, p=0,0001). Os níveis das moléculas de adesão não estavam alterados nos DM1 com retinopatia. Os dados sugerem que as alterações macrovasculares são mais prevalentes na presença de RD (118).

A neuropatia autonômica diabética (NAD) é gerada por insuficiência neurovascular, lesão auto-imune, deficiência do fator de crescimento neuro-hormonal que se iniciam com a hiperglicemia persistente (119). Na patogênese da NAD há ativação das vias alternativas de metabolismo da glicose (via do poliol, ativação da PKC) e formação de produtos finais da glicação avançada não enzimática em nervos e proteínas da parede vascular, com hipóxia e aumento de radicais livres, levando a DE. Por tudo isso, a NAD está associada à DE no DM1 (119, 120).

## 2.5 DE como marcador de risco cardiovascular no DM1

A DE ocorre precocemente no desenvolvimento da doença aterosclerótica, precedendo alterações estruturais da parede dos vasos (121). Estudos sugerem que o manejo dos fatores de risco de doença cardiovascular está associado a melhora da DMF (121). Ainda, a preservação da função endotelial parece conferir proteção para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares futuros em indivíduos com doença aterosclerótica já estabelecida (85). Neunteufl e col. seguiram pacientes com suspeita de doença coronariana por 5 anos, dos quais 40% com dor atípica e 60% com angina típica. No grupo com DMF abaixo de 10% (anormal) a frequência de eventos foi de 50% vs 15% naqueles com resposta normal. Curiosamente, nenhum paciente com vasodilatação normal apresentou eventos no primeiro mês após a avaliação contra 13% de eventos no grupo com resposta anormal (122). O

*status* endotelial, portanto, parece servir como um marcador de risco de doença cardiovascular, e a presença de DE pode refletir um fenótipo vascular com maior predisposição para aterosclerose.

Vários estudos têm documentado que pacientes com DM1 possuem doença coronariana precoce e mais severa, com comprometimento de todas as artérias coronarianas, incluindo segmentos distais (123). Os estudos de Laine e cols. sugerem que a redução do óxido nítrico no DM1 possa ser o evento precursor para DE e doença cardiovascular precoce (124).

O valor preditivo para mortalidade cardiovascular de marcadores de DE como o vWf foi avaliado no estudo HOORN (125). Este estudo foi uma coorte populacional de 2484 indivíduos caucasianos com 50-70 anos de idade, entre 1989 e 1992 onde 27% apresentavam DM2 e 27% apresentavam intolerância à glicose. Após 5 anos de acompanhamento, 58 indivíduos evoluíram para o óbito. Quando se avaliou o vWf, comparando os níveis encontrados no tercil superior ( $>1,56$  UI/ml) em relação aos dois tercís inferiores ( $<1,56$  UI/ml), o risco relativo para mortalidade por todas as causas associado ao vWf no tercil superior foi de 2,03 (IC95%: 1,19-3,47). Estes resultados sugerem que o vWf, como marcador de disfunção endotelial, seja um preditor independente de morte cardiovascular.

Em pacientes com DM1, o vWf está, em geral, aumentado em comparação com indivíduos saudáveis (6). Este aumento é maior na presença de micro e macroalbuminúria em relação aos pacientes normoalbuminúricos e correlaciona-se positivamente com a PCR ( $r=0,44$   $p<0,0005$ ), indicando associação entre disfunção endotelial e inflamação vascular (6). Os mecanismos pelos quais o risco cardiovascular está associado a níveis elevados de vWf não são bem conhecidos, mas refletem disfunção endotelial generalizada e um estado pró-trombótico (126).

Em indivíduos com DM1, marcadores inflamatórios como a PCR, interleucina-6 (IL-6) e TNF- $\alpha$  também são importantes determinantes de inflamação. No estudo *EURODIAB Prospective Complications Study*, um estudo caso-controle aninhado de 348 pacientes obtido de 543 participantes do *EURODIAB IDDM Complications Study Group* foram analisados marcadores inflamatórios como CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 em indivíduos com DM1 e indivíduos sem diabetes e comparados com os níveis de marcadores de disfunção endotelial como a E-seletina e a molécula vascular da célula de adesão-1 (VCAM-1). As medidas de inflamação estiveram diretamente associadas com a duração do DM, controle glicêmico, perfil lipídico, pressão sistólica e com os marcadores de DE. A PCR apresentou-se como preditor de todas as causas de mortalidade cardiovascular, estando relacionada com outros fatores de risco (9).

Em um estudo transversal que avaliou a associação entre PCR com fatores de risco e complicações vasculares nos indivíduos da coorte do DCCT/EDIC demonstrou que a PCR estava elevada nos DM1 em relação aos controles e correlacionou-se positivamente com a HbA1c, índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal (CA), pressão arterial diastólica (PAD), triglicerídios e LDL ( $p < 0,0001$ ). A PCR não estava associada com complicações vasculares (127).

## 2.6 Manejo clínico da disfunção endotelial no DM1

O manejo da DE no DM1 requer bom controle glicêmico, com ênfase, principalmente nas glicemias pós-prandiais (128). Níveis adequados de pressão arterial, manejo da dislipidemia, suspensão do tabagismo, dieta pobre em lipídios e estímulo à prática da atividade física também são importantes (129-131). O benefício

do uso de agentes anti-oxidantes como a vitamina C e E é controverso (129, 132). No entanto, a associação da vitamina C ao bom controle glicêmico foi capaz de melhorar a DE no DM (113).

As estatinas aumentam a biodisponibilidade do NO e diminuem a produção de superóxido, provavelmente interferindo com a atividade do NAD(P)H e melhoram a função endotelial, independente do efeito de redução do colesterol (128). O uso da atorvastatina em pacientes com dislipidemia, sem DM e com DE, evidenciou que a dose de 40 mg/dia melhora a FMD (2,6% basal para 4,0% e 6% após o uso respectivamente por 1 a 6 semanas), mas após suspensão da droga, este efeito é revertido em 36 hs (133). Em indivíduos com DM1 e microalbuminúria, o uso da estatina parece apresentar efeito na FMD endotélio-dependente e independente, provavelmente secundário a sua ação pleiotrófica, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando a disponibilidade do NO (134).

O uso do inibidor da enzima conversora da angiotensina II (IECA) enalapril, em 91 indivíduos com DM 1, sem complicações vasculares, por um período de 6 meses, não demonstrou benefício na melhora da função endotelial (135). Já pacientes com DM1 normotensos, mas com microalbuminúria, os IECA parecem melhorar a vasodilatação endotélio-dependente e independente (136).

O uso do antagonista do receptor da angiotensina II, losartan 50 mg/dia, por 4 semanas no Diabetes Melito tipo 2 (DM2) também melhorou a DMF (137).

A combinação do uso de inibidores do receptor da enzima conversora de angiotensina II (irbesartan) com a estatina em indivíduos com DM2 parece melhorar o estresse oxidativo, o processo inflamatório e com isso a DE (138).

As tiazodilinedionas parecem ter efeito inibitório das e-NOS, reduzindo significativamente a produção de peróxinitrito, melhorando a DE (139).



Por último, substâncias que ajam como SOD ou catalases miméticos têm sido avaliadas, em estudos em animais, como drogas promissoras no bloqueio do estresse oxidativo (140), entretanto, até o presente momento, o melhor modo de reverter a DE é através do controle dos fatores de risco.

---

---

***JUSTIFICATIVA***

### **3 JUSTIFICATIVA**

Considerando-se o aumento significativo da prevalência de diabetes em crianças e adolescentes e o risco aumentado de desenvolver doença cardiovascular precoce nesta população, torna-se importante avaliar a presença de disfunção endotelial como marcador prognóstico para o desenvolvimento de complicações vasculares e detecção de aterosclerose sub-clínica para que sejam realizadas medidas de prevenção primária de eventos cardiovasculares no DM1.

Neste sentido, pretendemos analisar os fatores envolvidos com a disfunção endotelial no DM1, como o tempo de surgimento, e o impacto do controle metabólico recente e histórico bem como a associação com a presença de microalbuminúria, para que possamos avaliar a melhor estratégia de prevenção das complicações vasculares do DM.

---

---

## **OBJETIVOS**

## **4.OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

- Avaliar a função endotelial através da Dilatação Arterial Mediada por Fluxo em indivíduos com DM1 em comparação a voluntários saudáveis.

### **Objetivos secundários:**

- Analisar fatores que possam estar associados com a disfunção endotelial no DM1 como o tempo de DM1, o controle glicêmico e a presença de microalbuminúria.

---

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA***

---

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993 Jun 10;328(23):1676-85.
2. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, Leland OS, Busick EJ, Asmal AC, et al. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 1987 Apr 1;59(8):750-5.
3. Morrish NJ, Stevens LK, Fuller JH, Keen H, Jarrett RJ. Incidence of macrovascular disease in diabetes mellitus: the London cohort of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics. *Diabetologia*. 1991 Aug;34(8):584-9.
4. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005 Dec 22;353(25):2643-53.
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
6. Schalkwijk CG, Poland DC, van Dijk W, Kok A, Emeis JJ, Drager AM, et al. Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. *Diabetologia*. 1999 Mar;42(3):351-7.
7. Lechleitner M, Koch T, Herold M, Dzien A, Hoppichler F. Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association

with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med.* 2000 Jul;248(1):67-76.

8. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest.* 1995 Sep;96(3):1395-403.

9. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, Giorgino F, Ebeling P, Fuller JH, et al. 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 Jul;26(7):2165-73.

10. 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 Apr;51(4):1157-65.

11. 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 Feb 19;41(4):661-5.

12. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, Irjala K, Ronnema T, Hartiala JJ, et al. Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation.* 2001 Dec 11;104(24):2943-7.

13. Juonala M, Viikari JS, Laitinen T, Marniemi J, Helenius H, Ronnema T, et al. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: the cardiovascular risk in young Finns study. *Circulation.* 2004 Nov 2;110(18):2918-23.



14. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997 Jul;20(7):1183-97.
15. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.
16. WHO Multinational Project for Childhood Diabetes. WHO Diamond Project Group. *Diabetes Care*. 1990 Oct;13(10):1062-8.
17. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2008 Jan;31 Suppl 1:S55-60.
18. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999 Dec;42(12):1395-403.
19. IDF. Incidence of Diabetes. *Diabetes Atlas: EATLAS*; 2006.
20. Green A, Patterson CC. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia*. 2001 Oct;44 Suppl 3:B3-8.
21. Haynes A, Bower C, Bulsara MK, Jones TW, Davis EA. Continued increase in the incidence of childhood Type 1 diabetes in a population-based Australian sample (1985-2002). *Diabetologia*. 2004 May;47(5):866-70.
22. Ionescu-Tirgoviste C, Guja C, Calin A, Mota M. An increasing trend in the incidence of type 1 diabetes mellitus in children aged 0-14 years in Romania--ten years (1988-1997) EURODIAB study experience. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004 Jul;17(7):983-91.
23. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes Care*. 2000 Oct;23(10):1516-26.

24. Tuomilehto J. Finland: highest incidence of childhood diabetes. *Diabetes* 1993;44:30-3.
25. Soltész G. *Diabetes Atlas*. 2nd ed.: Chap 2,113-34; 2003.
26. Campos JJBd, Almeida HGG, Ioshida LC, Franco JL. Incidência de diabetes Mellitus insulino dependente (Tipo I) na cidade de Londrina - PR. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 1998;42(1):36-44.
27. Ferreira SR, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simoes AC, Venturelli CR. Population-based incidence of IDDM in the state of Sao Paulo, Brazil. *Diabetes Care*. 1993 May;16(5):701-4.
28. Lisboa HR, Graebin R, Butzke L, Rodrigues CS. Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1998 Dec;31(12):1553-6.
29. Molven A, Ringdal M, Nordbo AM, Raeder H, Stoy J, Lipkind GM, et al. Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):1131-5.
30. Imagawa A, Hanafusa T, Uchigata Y, Kanatsuka A, Kawasaki E, Kobayashi T, et al. Fulminant type 1 diabetes: a nationwide survey in Japan. *Diabetes Care*. 2003 Aug;26(8):2345-52.
31. Maldonado M, Hampe CS, Gaur LK, D'Amico S, Iyer D, Hammerle LP, et al. Ketosis-prone diabetes: dissection of a heterogeneous syndrome using an immunogenetic and beta-cell functional classification, prospective analysis, and clinical outcomes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov;88(11):5090-8.
32. Kantarova D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res*. 2007;56(3):255-66.
33. Alizadeh BZ, Koeleman BP. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. *Clin Chim Acta*. 2008 Jan;387(1-2):9-17.

34. Park Y. Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 Sep;77 Suppl 1:S110-5.
35. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol.* 2003 Feb;56(1):1-10.
36. Akerblom HK, Vaarala O, Hyoty H, Ilonen J, Knip M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet.* 2002 May 30;115(1):18-29.
37. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes.* 2005 Dec;54 Suppl 2:S52-61.
38. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, et al. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Jan;27 Suppl 1:S79-83.
39. ADA. Complications of Diabetes in the United States. 2007 [updated 2007; cited]; Available from: [Complications of Diabetes in the United States](#).
40. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):837-53.
41. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):977-86.
42. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.
43. Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension.* 1992 Feb;19(2):117-30.

44. Bhagat K, Vallance P. Inducible nitric oxide synthase in the cardiovascular system. *Heart*. 1996 Mar;75(3):218-20.
45. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes. *Diabetologia*. 2000 Feb;43(2):137-47.
46. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):2002-12.
47. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999 Jun 10;399(6736):597-601.
48. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002 Jun 28;90(12):1243-50.
49. Hutcheson IR, Griffith TM. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *Am J Physiol*. 1991 Jul;261(1 Pt 2):H257-62.
50. Pohl U, Busse R. Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. *Am J Physiol*. 1989 Jun;256(6 Pt 2):H1595-600.
51. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989 Oct 28;2(8670):997-1000.
52. Pomilio M, Mohn A, Verrotti A, Chiarelli F. Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002 Apr;15(4):343-61.
53. Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation*. 2002 Aug 6;106(6):640-2.
54. Hadcock S, Richardson M, Winocour PD, Hatton MW. Intimal alterations in rabbit aortas during the first 6 months of alloxan-induced diabetes. *Arterioscler Thromb*. 1991 May-Jun;11(3):517-29.

55. Lin SJ, Hong CY, Chang MS, Chiang BN, Chien S. Increased aortic endothelial death and enhanced transendothelial macromolecular transport in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 1993 Oct;36(10):926-30.
56. Aagenaes O, Moe H. Light- and electron-microscopic study of skin capillaries of diabetics. *Diabetes*. 1961 Jul-Aug;10:253-9.
57. Rosenstock J, Challis P, Strowig S, Raskin P. Improved diabetes control reduces skeletal muscle capillary basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1988 Feb 19;4(3):167-75.
58. Cester N, Rabini RA, Salvolini E, Staffolani R, Curatola A, Pugnali A, et al. Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. *Eur J Clin Invest*. 1996 Jul;26(7):569-73.
59. Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 1986 Dec 2;132(1):75-8.
60. Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH<sub>2</sub>-TxA<sub>2</sub>. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 2):H1327-33.
61. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993 Dec;88(6):2510-6.
62. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1992 Dec;90(6):2548-54.
63. Elliott TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted

vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Dec;85(6):687-93.

64. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Mar 1;27(3):567-74.

65. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1996 Jan 1;97(1):22-8.

66. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992 Aug;35(8):771-6.

67. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, et al. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2003 Jun 5;348(23):2294-303.

68. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998 May 5;97(17):1695-701.

69. Houben AJ, Schaper NC, de Haan CH, Huvers FC, Slaaf DW, de Leeuw PW, et al. Local 24-h hyperglycemia does not affect endothelium-dependent or -independent vasoreactivity in humans. *Am J Physiol*. 1996 Jun;270(6 Pt 2):H2014-20.

70. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*. 2004 Apr 13;109(14):1750-5.

71. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest.* 1994 Dec;94(6):2511-5.
72. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest.* 1994 Sep;94(3):1172-9.
73. Makimattila S, Mantysaari M, Groop PH, Summanen P, Virkamaki A, Schlenzka A, et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.* 1997 Feb 4;95(3):618-25.
74. Dogra G, Rich L, Stanton K, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia.* 2001 May;44(5):593-601.
75. Ladeia AM, Ladeia-Frota C, Pinho L, Stefanelli E, Adan L. Endothelial dysfunction is correlated with microalbuminuria in children with short-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2005 Aug;28(8):2048-50.
76. Kato M, Shiode N, Yamagata T, Matsuura H, Kajiyama G. Coronary segmental responses to acetylcholine and bradykinin in patients with atherosclerotic risk factors. *Am J Cardiol.* 1997 Sep 15;80(6):751-5.
77. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000 Apr 25;101(16):1899-906.
78. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the

International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 16;39(2):257-65.

79. Haller MJ, Stein J, Shuster J, Theriaque D, Silverstein J, Schatz DA, et al. Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2007 Aug;8(4):193-8.

80. Khan F, Elhadd TA, Greene SA, Belch JJ. Impaired skin microvascular function in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2000 Feb;23(2):215-20.

81. Aellig WH. A new technique for recording compliance of human hand veins. *Br J Clin Pharmacol*. 1981 Mar;11(3):237-43.

82. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T. A noninvasive measurement of reactive hyperemia that can be used to assess resistance artery endothelial function in humans. *Am J Cardiol*. 2001 Jan 1;87(1):121-5, A9.

83. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.

84. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1314-9.

85. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002 Apr 2;105(13):1567-72.



86. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolf G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol.* 2000 Jul 15;86(2):207-10.
87. Marchioli R, Schweiger C, Levantesi G, Tavazzi L, Valagussa F. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids.* 2001;36 Suppl:S53-63.
88. Rabago Rodriguez R, Gomez-Diaz RA, Tanus Haj J, Avelar Garnica FJ, Ramirez Soriano E, Nishimura Meguro E, et al. Carotid intima-media thickness in pediatric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007 Oct;30(10):2599-602.
89. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):840-4.
90. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996 Mar;19(3):257-67.
91. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1997 Jul 1;96(1):25-8.
92. Lopez-Ongil S, Senchak V, Saura M, Zaragoza C, Ames M, Ballermann B, et al. Superoxide regulation of endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26423-7.
93. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
94. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care.* 2003 May;26(5):1589-96.

95. Shkhvatsabaya IK, Erina EV, Almusai AI. Venous tone in essential hypertension. *Cor Vasa*. 1977;19(3):184-96.
96. Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, et al. Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in high-glucose medium. *Diabetes*. 1995 May;44(5):520-6.
97. Park JY, Ha SW, King GL. The role of protein kinase C activation in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Perit Dial Int*. 1999;19 Suppl 2:S222-7.
98. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988 May 19;318(20):1315-21.
99. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*. 1984 Oct;101(4):527-37.
100. Spitaler MM, Graier WF. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002 Apr;45(4):476-94.
101. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001 Feb 2;88(2):E14-22.
102. Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res*. 1997 Apr;34(1):164-8.
103. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, et al. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1349-54.

104. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 1999 Jul;34(1):146-54.
105. Sorensen VR, Mathiesen ER, Clausen P, Flyvbjerg A, Feldt-Rasmussen B. Impaired vascular function during short-term poor glycaemic control in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med.* 2005 Jul;22(7):871-6.
106. Ceriello A, Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of simvastatin treatment. *Diabetes.* 2004 Mar;53(3):701-10.
107. Kadono T, Sugiyama H, Hoshiai M, Osada M, Tan T, Naitoh A, et al. Endothelial function evaluated by flow-mediated dilatation in pediatric vascular disease. *Pediatr Cardiol.* 2005 Jul-Aug;26(4):385-90.
108. Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes.* 1987 Jul;36(7):808-12.
109. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care.* 1999 Jan;22(1):99-111.
110. Zhang L, Krzentowski G, Albert A, Lefebvre PJ. Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabetes Care.* 2001 Jul;24(7):1275-9.
111. Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Feb;94(2):410-5.

112. Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szabo C, Green DE, Warnke LA, et al. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia*. 2007 Jul;50(7):1523-31.
113. Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):649-54.
114. Donnelly R, Yeung JM, Manning G. Microalbuminuria: a common, independent cardiovascular risk factor, especially but not exclusively in type 2 diabetes. *J Hypertens Suppl*. 2003 Mar;21(1):S7-12.
115. Shestakova MV, Jarek-Martynowa IR, Ivanishina NS, Kuharenko SS, Yadhinskaya MN, Aleksandrov AA, et al. Role of endothelial dysfunction in the development of cardiorenal syndrome in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Jun;68 Suppl1:S65-72.
116. Stehouwer CD, Fischer HR, van Kuijk AW, Polak BC, Donker AJ. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes*. 1995 May;44(5):561-4.
117. Lambert J, Aarsen M, Donker AJ, Stehouwer CD. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 May;16(5):705-11.
118. Glowinska-Olszewska B, Urban M, Urban B, Tolwinska J, Szadkowska A. The association of early atherosclerosis and retinopathy in adolescents with type 1 diabetes: preliminary report. *Acta Diabetol*. 2007 Sep;44(3):131-7.
119. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003 May;26(5):1553-79.

120. Doupis J, Lyons TE, Wu S, Gnardellis C, Dinh T, Veves A. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jun;94(6):2157-63.
121. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res.* 1997 Apr;34(1):55-68.
122. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Soregi G, Lehr S, et al. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Feb;35(2):277-83.
123. Valsania P, Zarich SW, Kowalchuk GJ, Kosinski E, Warram JH, Krolewski AS. Severity of coronary artery disease in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am Heart J.* 1991 Sep;122(3 Pt 1):695-700.
124. Laine H, Sundell J, Nuutila P, Raitakari OT, Luotolahti M, Ronnema T, et al. Insulin induced increase in coronary flow reserve is abolished by dexamethasone in young men with uncomplicated type 1 diabetes. *Heart.* 2004 Mar;90(3):270-6.
125. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Dec;19(12):3071-8.
126. Mannucci PM. von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Sep;18(9):1359-62.
127. Jenkins AJ, Rothen M, Klein RL, Moller K, Eldridge L, Zheng D, et al. Cross-sectional associations of C-reactive protein with vascular risk factors and vascular complications in the DCCT/EDIC cohort. *J Diabetes Complications.* 2008 May-Jun;22(3):153-63.

128. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation*. 2002 Sep 3;106(10):1211-8.
129. Economides PA, Khaodhjar L, Caselli A, Caballero AE, Keenan H, Bursell SE, et al. The effect of vitamin E on endothelial function of micro- and macrocirculation and left ventricular function in type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005 Jan;54(1):204-11.
130. Roberts CK, Won D, Pruthi S, Lin SS, Barnard RJ. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 Sep;73(3):249-59.
131. Schwab KO, Doerfer J, Krebs A, Krebs K, Schorb E, Hallermann K, et al. Early atherosclerosis in childhood type 1 diabetes: role of raised systolic blood pressure in the absence of dyslipidaemia. *Eur J Pediatr*. 2007 Jun;166(6):541-8.
132. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF, Jr., Creager MA. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Dec;285(6):H2392-8.
133. Taneva E, Borucki K, Wiens L, Makarova R, Schmidt-Lucke C, Luley C, et al. Early effects on endothelial function of atorvastatin 40 mg twice daily and its withdrawal. *Am J Cardiol*. 2006 Apr 1;97(7):1002-6.
134. Dogra GK, Watts GF, Chan DC, Stanton K. Statin therapy improves brachial artery vasodilator function in patients with Type 1 diabetes and microalbuminuria. *Diabet Med*. 2005 Mar;22(3):239-42.
135. Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, Thomson H, Thorne SA, Powe AJ, et al. Effect of enalapril on endothelial function in young insulin-dependent diabetic

patients: a randomized, double-blind study. *J Am Coll Cardiol.* 1998 May;31(6):1330-5.

136. Arcaro G, Zenere BM, Saggiani F, Zenti MG, Monauni T, Lechi A, et al. ACE inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care.* 1999 Sep;22(9):1536-42.

137. Cheetham C, Collis J, O'Driscoll G, Stanton K, Taylor R, Green D. Losartan, an angiotensin type 1 receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Nov 1;36(5):1461-6.

138. Ceriello A, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Piconi L, Quagliaro L, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation.* 2005 May 17;111(19):2518-24.

139. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4699-707.

140. Nassar T, Kadery B, Lotan C, Da'as N, Kleinman Y, Haj-Yehia A. Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2002 Feb 1;436(1-2):111-8.

---

***ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS***

---



## 6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

### **Endothelial Dysfunction Occurs in Adolescents with Type 1 Diabetes Under 5 Years of Disease and is Associated to Microalbuminuria and Long-Term Glycemic Control**

Gislaine V. Cé<sup>1,2</sup>, MSC; Antônio M. V. Silva<sup>3</sup>, PHD; Marcia K. C. Puñales<sup>2</sup>, PHD; Andréa C. Castro<sup>4</sup>, MSc; Luis E. Rohde<sup>5</sup>, ScD; Marcello C. Bertoluci<sup>1,6</sup>, MD,PHD.

**Running title:** Endothelial dysfunction and Type 1 Diabetes

Grant support: Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), Brazil. Dr Rohde is supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq).

Correspondence: Marcello Bertoluci, M.D., Ph.D.

Rua Ildfonso Simões Lopes 99 Porto Alegre, RS, Brazil, 91330-180.

Phone: + 55 51 33347414 Fax: 55 51 33349925

E-mail: [mbertoluci@uol.com.br](mailto:mbertoluci@uol.com.br)

---

<sup>1</sup>POST GRADUATION PROGRAM OF MEDICAL SCIENCE, FEDERAL UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL; <sup>2</sup>INSTITUTO DA CRIANÇA COM DIABETES, GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO, BRAZIL; <sup>3</sup>DEPARTMENT OF PHYSIOTHERAPY AND REHABILITATION, FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA MARIA, BRAZIL; <sup>4</sup>BIOCHEMICAL LABORATORY, GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO, BRAZIL; <sup>5</sup>CARDIOLOGY DIVISION OF HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, BRAZIL; <sup>6</sup>INTERNAL MEDICINE DIVISION OF HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, BRAZIL.

## ABSTRACT

**OBJECTIVE:** The aim of the study was to evaluate the prevalence of endothelial dysfunction (ED) in young Type 1 diabetes (T1DM) patients, and its association to disease duration, recent and long-term past metabolic control.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS:** In a cross-sectional study, 57 adolescents with T1DM and 10 non-diabetic controls were recruited. ED was evaluated by flow mediated dilation (FMD) of the brachial artery using high-resolution ultrasound imaging after reactive hyperemia. Patients performed intensive self monitoring blood glucose for 30 days before vascular studies.

**RESULTS:** Of 57 T1DM patients studied, 28 (49%) presented ED, defined as a FMD  $\leq 8\%$ . FMD was significantly decreased in T1DM compared to controls ( $9.48 \pm 6.48\%$  vs.  $14.56 \pm 5.60\%$ ,  $p=0.023$ ). Nitrate-mediated dilation was decreased in T1DM patients compared to controls ( $22.26 \pm 9.2\%$  vs.  $29.31 \pm 4.2\%$ ,  $p=0.02$ ,  $RV= >8\%$ ), but it was not different between T1DM with or without ED ( $p=0.72$ ). The duration of T1DM was longer in patients with ED compared to patients without ED ( $105 \pm 75$  vs.  $66 \pm 48$  months, respectively,  $p=0.02$ ). Duration of T1DM had a weak but statistically significant negative correlation with FMD ( $r=-0.284$  ;  $p=0.032$ ). HbA1c was not different in patients with or without ED ( $p= 0.10$ ) and was not associated to FMD ( $p=0.34$ ). However, we observed a significant negative correlation between FMD and HbA1c at 12-24 months before the vascular study ( $r=-0.289$ ;  $p=0.03$ ), particularly in recent onset ( $<5$  years) T1DM ( $r=-0.426$ ;  $p=0.02$ ). Also, FMD was decreased in microalbuminuric compared to normoalbuminuric patients ( $4.83 \pm 3.81\%$  vs.  $10.35 \pm 6.5\%$ ,  $p=0.015$ ).

**CONCLUSIONS:** Endothelial function of young T1DM patients is significantly impaired, even in the initial phases ( $< 5$  years) of T1DM. ED is related to long-term metabolic control and microalbuminuria.

## INTRODUCTION

Patients with diabetes mellitus (DM) are at high-risk for developing micro and macrovascular complications (1). Endothelial dysfunction (ED) has been suggested to be a precursor of both complications in Type 1 diabetes (T1DM) (2) and is present in patients with more than 5 years of disease associated or not to microalbuminuria (3-5). Although ED may be a risk factor for late vascular complications, it is not clear whether ED occurs before 5 years of T1DM or precedes the onset of microalbuminuria. The correlation between timing of endothelial dysfunction and duration of diabetes is until now not well established (4, 6). Indeed, it is important to define if ED occurs early in the natural history of T1DM, because it can be clinically useful as an early predictor of vascular diabetic complications.

The endothelium-dependent vasodilation during reactive hyperemia is predominantly modulated by local release of nitric oxide (NO) (4, 6). Both acute and chronic high-glucose concentrations can interfere in endothelial NO homeostasis. Acute hyperglycemia reduces NO production through the polyol-pathway and protein kinase C activation, while sustained chronic hyperglycemia may induce advanced glycosylated end-stage products (AGEs) accumulation, which in turns leads to increased oxidative stress and ED (7). Normal individuals can develop vasodilation impairment after an oral glucose tolerance test which is rapidly overturned as soon as blood glucose is normalized. This effect, however, is less reversible in patients with diabetes (8, 9). Thus it is conceivable that chronic hyperglycemia may be associated to sustained ED due to chronic structural alterations in the artery wall. HbA1c has been largely used as a marker of chronic hyperglycemia, however the association of an isolated measurement of HbA1c and ED seems to be weak.

Although significant inverse correlations were observed between HbA1c and flow-mediated vasodilation in some studies (5), not all of them have demonstrated a clear association between HbA1c and ED in diabetes (10). Unexpectedly, a positive correlation between HbA1c and flow-mediated vasodilation has also been found (11). There is scarce data evaluating the effect of longer periods of exposure to hyperglycemia assessed by serial analysis of HbA1c on endothelial function in T1DM.

The objective of the present study was to evaluate the prevalence of ED in young T1DM patients, particularly in short-duration disease (less than 5 years), and its association to recent and past metabolic control.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

**Study Design and Patients.** We performed a cross-sectional study, involving 57 T1DM patients, with 13 to 28 years of age and disease duration of less than 10 years. Ten non-diabetic adolescents were also enrolled as age-matched controls. Patients were consecutively recruited from the ambulatory diabetes unit, at a public health service for the treatment of diabetes in infancy and adolescence. Data were collected from October 2007 to November 2008.

Type 1 diabetes was clinically defined when diagnosis was before 20 years of age and body mass index (BMI)  $< 28\text{kg/m}^2$ , in the absence of a family history of DM and if insulin therapy was required during the first year of diagnosis. Inclusion criteria also included BMI between  $16\text{-}28\text{ kg/m}^2$ , at least a late pubertal Tanner (IV or V), intensive insulin therapy and patients who were highly motivated and able to do intensive self monitoring blood glucose (SMBG). Exclusion criteria were present or

past tobacco use, clinical hypertension, known hypothyroidism, statin use, current pregnancy and any history of previous neoplasia or vascular disease.

Diabetic nephropathy was defined as proteinuria greater than 30 mg/g of creatinine on 3 urinary albumin excretion (UAE) (1 morning spot, corrected by creatinine, and two 24h collection), in the absence of urinary tract infection, according to the guidelines of the American Diabetes Association (12). All patients were evaluated by an experienced ophthalmologist for the presence of retinopathy.

The study was approved by the local ethical research committee, and all subjects signed a written informed consent.

**Research Protocol.** At the first visit, patients were informed about the study and a consent form was read, filled and signed out by patients and guardians. In a second visit, we performed a complete clinical interview and physical exam. Anthropometric data including BMI and waist circumference were determined. Patients were asked to perform intensive SMBG for the 30 days before the endothelial function determination (pre-meal [daily], 2 hours post-prandial at breakfast, lunch and dinner [daily] and at 3 PM [weekly]).

**Endothelial function study.** Endothelial function test was carried out at day 30. Blood was drawn for biochemical determinations after a 12h fasting period and the usual insulin dosage was used. Exams were carried out in the morning, after a mild breakfast, without caffeine and fat high foods. Endothelial function was determined by flow mediated dilation (FMD) of the brachial artery, using a high-resolution vascular ultrasound (EnVisor CHD, Philips, Bothell, WA, USA) and a 3–12 MHz linear-array transducer (L12-3, Philips, Bothell, WA, USA), according to internationally accepted guidelines (13). The validity of this method was confirmed in

previous studies (10, 14, 15). Briefly, the patient rested in the supine position comfortably in a controlled temperature room (at 24°C) with the left arm relaxed and extended laterally on a soft base. Capillary glucose and systemic blood pressure were measured by a mercury sphygmomanometer in the contra-lateral arm. With the transducer placed 5 cm above the antecubital fossa, a rest scan was performed and the antero-lateral diameters of the brachial artery were measured (baseline 1). Reactive hyperemia (endothelium-dependent dilation) was induced by inflating a cuff 50 mmHg above the systolic blood pressure for 5 minutes. Brachial artery was scanned at the same position 45-60 seconds after the cuff was deflated and the artery diameters were again measured. Measurements were taken in triplicates at end-diastole in three consecutive cycles, coincident with the R-wave on EKG. The maximal percent dilation from baseline (peak FMD [%]) was then assessed. ED was considered to be present if peak FMD was  $\leq 8\%$  (16, 17). After 30 minutes of rest, baseline measurements were repeated (baseline 2), a sub-lingual nitrate (0,3mg) spray was administered, and the maximal non-endothelial-dependent dilation was assessed 4 minutes later. Smooth muscle dysfunction was considered when nitrate mediated dilation was  $\leq 8\%$ . The images were analyzed by one investigator who was blinded to clinical data.

**Biochemical measurements.** UEA and HbA1c were determined by immunoturbidimetry (Cobas Integra 400; Roche). Plasma glucose was analyzed by the glucose-peroxidase method, through colorimetric enzymatic reactions. Serum total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride concentrations were also measured by the colorimetric enzymatic method (Modular; Roche).

Creatinine was measured by Jaffe method (Modular; Roche) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) by nephelometry (BN II; Dade Behring).

**Historical data.** Historical data from HbA1c at 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 24 months before endothelial evaluation were obtained from routine medical records. Historical HbA1c were obtained at the same institution, using the same analytical technique. Quality control of HbA1c along the 24 months was carefully revised by a blind member of the medical team and all enrolled patients had complete HbA1c data.

**Statistical Analysis.** Results are expressed as means and standard deviation or absolute numbers and percentages. Normal variables were compared through the Student's t-test and categorical variables were compared through Chi-Squared method. The nonparametric U-test was used to analyze urinary albumin/creatinine and CRP. Comparisons of data among groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison test. For correlation analysis, univariate Pearson's correlation coefficients ( $r$ ) were calculated. For statistical purposes, HbA1c historical data were average and mean HbA1c 1-year and 2-years before endothelial function evaluation were analyzed. Statistical significance was taken as a  $p$  value of less than 0.05.

## **RESULTS**

A total of 1.100 T1DM patients who attended the Diabetic Unit were screened, 60 T1DM fulfilled inclusion criteria and were invited to participate into the study. Of this group, 3 patients declined written consent, and 57 patients were included. Ten non-diabetic relatives subjects were invited as the control group.

Clinical and biochemical characteristics of T1DM and controls are compared in Table 1. No significant differences were found between groups with respect of age, BMI, abdominal waist, systolic and diastolic blood pressure, hs-CRP, serum creatinine, serum total cholesterol, LDLc and HDLc levels. Mean triglyceride level was decreased in T1DM group.

Of 57 T1DM patients studied, 28 (49%) had ED, defined as a peak FMD  $\leq 8\%$ . Mean FMD was significantly decreased in T1DM compared to controls ( $9.48 \pm 6.48\%$  versus  $14.56 \pm 5.60\%$ ;  $p=0.023$ , respectively). Nitrate-induced dilation was also significantly decreased in T1DM patients compared to controls ( $22.26 \pm 9.2\%$  vs  $29.31 \pm 4.20\%$ ,  $p=0.02$ ; Figure 1).

Clinical differences between T1DM patients with and without ED are shown in Table 2. No differences between groups were observed for most clinical characteristics, such as age, BMI, abdominal waist, systolic and diastolic blood pressure, fasting blood glucose, lipid profile, hs-CRP and presence of retinopathy. Microalbuminuria, however, was more prevalent in T1DM patients with ED than controls ( $22.2\%$  versus  $3.5\%$ ,  $p=0.04$ ; respectively). Also, the duration of T1DM was significantly longer in patients with ED when compared to patients without ED ( $105 \pm 75$  months vs.  $66 \pm 48$  months,  $p=0.02$ ; respectively). A significant negative linear correlation between duration of T1DM and FMD was found ( $r=-0.284$ ,  $p=0.032$ ; Figure 2). We also did not observed significant differences in clinical and biochemical characteristics of T1DM with or without ED in analysis restricted to patients with less than 5 years of disease (Table 3).

Baseline brachial artery diameter did not differ between controls and T1DM with ED ( $p=0.96$ ) and without ED patients ( $p=0.93$ ). As expected, FMD (%) was significantly decreased in T1DM with ED compared to patients without ED ( $p<0.0001$ ), but nitrate-



mediated dilation was not significantly different in T1DM patients with or without ED (Table 4).

HbA1c at the moment of the vascular analysis was not significantly different in patients with ED compared to those without ED ( $9.0 \pm 1.8\%$  vs.  $8.2 \pm 1.4\%$ ,  $p = 0.10$ ), and there was not a significant correlation between HbA1C and FMD ( $r = -0.128$ ,  $p = 0.34$ ). However, we found a significant negative correlation between HbA1c and FMD at 15 months ( $r = -0.303$ ,  $p = 0.02$ ) and at 12 to 24 months before the vascular study (Table 5A). Also, HbA1c at 12, 15 and 24 months and mean HbA1c in the period of 0-12 months and 12-24 months previously from the endothelial study were significantly higher in T1DM patients when they presented ED (Table 5B).

When we specifically analyzed T1DM patients with less than 5 years of disease duration, 10 of 28 (35.7%) presented ED. HbA1c at the moment of the vascular analysis was similar in patients with and without ED ( $8.2 \pm 0.9\%$  versus  $8.0 \pm 1.4\%$ ,  $p = 0.66$ ; respectively). We observed a moderate statistically significant negative correlation between FMD and historical HbA1c before the endothelial evaluation (at 12 months:  $r = -0.419$ ,  $p = 0.03$ ; at 15 months:  $r = -0.437$ ,  $p = 0.03$ ; within 12-24 months:  $r = -0.426$ ,  $p = 0.02$ ) (Table 5A, Figure 3). Mean HbA1c at 12 months before the endothelial evaluation was significantly higher in T1DM patients when they presented ED ( $p = 0.03$ ) (Table 5 B). Also when we analyzed SMBG of the 30 days before vascular test it was not significantly different between T1DM, with or without ED (Table 6).

In analysis stratified according to the presence of proteinuria, FMD was significantly decreased in T1DM microalbuminuric patients compared to normoalbuminuric ( $4.83 \pm 3.81$  versus  $10.35 \pm 6.50\%$ ,  $p = 0.015$ , respectively), Figure 4)

## DISCUSSION

In this study we demonstrated that endothelial function in T1DM patients is significantly impaired as seen by a decreased in percent of FMD compared to non-diabetic controls, independently of age, smoke, hypertension and hiperlipidemia. This was determined by a subset of 49% of patients who presented definite ED considering the criteria of less than 8.1% of dilation from basal arterial diameter. When considering only T1DM patients before 5 years of disease, ED occurred in 36%.

Although ED is relatively common in T1DM patients above 10 years of disease (10, 18), its presence before 5 years has not been clearly defined in current literature. Two recent studies indicated that ED may occur before 5 years of disease (3, 11), but other study did not confirm this observation (6).

Järvisalo (3), studying T1DM children under 4 years of disease with poor metabolic control (mean HbA1c 8.9%), compared ED prevalence to non-DM children and observed that 36% of the children with DM 1 presented ED as seen by a total FMD response in the lowest decile cutpoint for healthy children ( $FMD \leq 3.3\%$ ) (19). In addition, Dogra et al (10) examined whether endothelial function is impaired in T1DM under conditions of near-normoglycaemia and compared with age-matched healthy control subjects, observed that FMD was significantly lower in T1DM patients with microalbuminuria compared to normoalbuminuric diabetic patients and controls. In contrast, Ladeia et al (11) compared adolescents up to 3 years of T1DM with a mean HbA1c of 9.35% against non-DM individuals, found no differences in FMD. The present study is quite in agreement with the study of Järvisalo, in respect to the proportion of patients (36%) with ED before 5 years of disease, although we also found 3 patients with ED before 2 years of T1DM. These findings seen together

suggest that ED is a phenomenon that may occur quite early in the natural history of adolescents with T1DM, supporting the idea that it is a precursor of microvascular disease. By our data, we can conclude that duration of T1DM is an important risk factor for the presence of endothelial dysfunction.

Another important determinant for the presence of ED in T1DM patients in the present study was metabolic control, determined by HbA1c. Although no significant correlation was found between HbA1c at the moment of vascular test versus % of arterial dilation, we observed significant correlations with historical HbA1c and % of dilation. Both HbA1c at 12 and 15 months, and the mean HbA1c from 12 to 24 months before the vascular test inversely correlated to % of arterial dilation. While recent HbA1c, such those at 3, 6, 9 months and the mean of the first 12 months did not correlate. These data suggest that long-term metabolic control may have greater influence in ED than recent metabolic control. In agreement to this observation, we did not find any correlation between % of arterial dilation and glucose variability, as seen by the standard deviation of self monitoring blood glucose in the preceding 30 days of the vascular test. This data seems to be novel in literature, being interesting to speculate if that historical metabolic control may have a higher impact in ED than recent metabolic control. Indeed, the present study had limitations due to the cross-sectional design, and cause-effect relationship conclusions limited. Thus present data must be confirmed in future by longitudinal studies.

The mechanisms whereby T1DM is associated with ED are complex and not completely understood. It has been reported that the disease duration and microalbuminuria are related to ED (20), chronic hyperglycemia (10, 15, 18). Oxidative stress, polyol pathway activation, protein kinase C activation and presence of advanced glycation end-products are potential mechanisms involved (2, 21, 22).

The memory of glucose control has been considered recently by Ceriello (23) who pointed out that the mechanisms for propagating this “metabolic memory” appear to be focused on the non-enzymatic glycation process and on the excess of cellular reactive oxygen and nitrogen species, originating at the level of glycated mitochondrial proteins, and acting in concert with one another to maintain stress signaling independent of glucose levels. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) demonstrated the benefits of intensive treatment of T1DM in reducing glycemic levels and slowing the progression of microvascular complications as compared with conventional therapy (24). During the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study, despite HbA1c no longer differed substantially between groups at the end of the study, sustained significant benefit in risk reduction in those T1DM who had better control in the previous DCCT cohort, thus suggesting that the historical intensive control, might had a significant impact in the long-term risk for microvascular complications (25, 26).

Another important issue is to determine if vascular smooth muscle impairment occurs simultaneously or later than ED in T1DM. Singh et al studied 31 T1DM patients with duration of DM  $6.8 \pm 3.9$  years and 35 age-matched healthy children and concluded that ED was present in T1DM compared with controls but there was no difference in non-endothelial dependent vasodilation between groups, suggesting that ED may occur before smooth muscle dysfunction and increases in IMT (5).

In conclusion, endothelial function of T1DM patients is significantly impaired as seen by a decreased in percent of flow mediated vasodilation compared to non-diabetic controls. ED is a phenomenon that can occur before 5 years of disease and is related to both duration of disease and long-term glycemic control. Microalbuminuria was also associated positively to ED, indicating that the presence of ED might precedes

microalbuminuria in the natural history of microvascular complication in type 1 diabetes. The observation that nitrate dilation was normal in patients with ED suggests that structural damage to the artery wall might not have happened to a great extent and may be still reversible. This study reinforces the need for intensive glucose control in early years of type 1 diabetes to prevent future vascular complications.

## REFERENCES

1. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993 Jun 10;328(23):1676-85.
2. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
3. Jarvisalo MJ, Lehtimäki T, Raitakari OT. Determinants of arterial nitrate-mediated dilatation in children: role of oxidized low-density lipoprotein, endothelial function, and carotid intima-media thickness. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23):2885-9.
4. Jarvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*. 2004 Apr 13;109(14):1750-5.
5. 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 Feb 19;41(4):661-5.
6. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1314-9.
7. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*. 1984 Oct;101(4):527-37.
8. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Jul;34(1):146-54.

9. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998 May 5;97(17):1695-701.
10. Dogra G, Rich L, Stanton K, Watts GF. Endothelium-dependent and independent vasodilation studies at normoglycaemia in type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia*. 2001 May;44(5):593-601.
11. Ladeia AM, Ladeia-Frota C, Pinho L, Stefanelli E, Adan L. Endothelial dysfunction is correlated with microalbuminuria in children with short-duration type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2005 Aug;28(8):2048-50.
12. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32 Suppl 1:S13-61.
13. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 16;39(2):257-65.
14. Ceriello A, Kumar S, Piconi L, Esposito K, Giugliano D. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):649-54.
15. Kadono T, Sugiyama H, Hoshiai M, Osada M, Tan T, Naitoh A, et al. Endothelial function evaluated by flow-mediated dilatation in pediatric vascular disease. *Pediatr Cardiol*. 2005 Jul-Aug;26(4):385-90.
16. Gaenger H, Neumayr G, Marschang P, Sturm W, Kirchmair R, Patsch JR. Flow-mediated vasodilation of the femoral and brachial artery induced by exercise in healthy nonsmoking and smoking men. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Nov 1;38(5):1313-9.

17. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 21;41(10):1769-75.
18. Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, et al. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res*. 1997 Apr;34(1):164-8.
19. Jarvisalo MJ, Ronnema T, Volanen I, Kaitosaari T, Kallio K, Hartiala JJ, et al. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jan;282(1):H87-92.
20. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Sep;28(3):573-9.
21. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988 May 19;318(20):1315-21.
22. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
23. Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;94(2):410-5.
24. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The



Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N Engl J Med. 1993 Sep 30;329(14):977-86.

25. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. JAMA. 2002 May 15;287(19):2563-9.

26. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. JAMA. 2003 Oct 22;290(16):2159-67.

**Table 1 - Clinical and biochemical characteristics of T1DM patients and non-diabetic subjects**

	Controls N=10	T1DM N=57	p
Age (years)	20.2±3.7	17.7±3.7	0.051
Gender (Male/Female)	5/5	26/31	NS
Duration of disease (years)	NA	6.7±5.6	NA
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.6±3.1	22.3±2.5	0.418
Abdominal Waist (cm)	73.2±7.8	77.7±6.8	0.064
SBP (mmHg)	112.0±9.2	106.3±10.9	0.12
DBP (mmHg)	72.0±6.3	67.5±7.4	0.077
HbA1c (%)	5.13±0.22	8.59±1.66	0.000
Fasting Blood Glucose (mg/dl)	84.8±11.3	189.4±83.0	0.000
CRP-US (mg/l)	2.49±3.01	1.95±2.46	0.53
Total Cholesterol (mg/dl)	168.5±43.2	162.7±34.8	0.64
LDLc (mg/dl)	93.6±40.7	93.0±29.3	0.95
HDLc (mg/dl)	54.1±25.3	56.3±14.0	0.69
Triglycerides (mg/dl)	118.2±46.6	77.9±46.9	0.0014
Serum Creatinine (mg/dl)	0.78±0.16	0.77±0.17	0.85
Urinary albumin/creatinine (mg/g)	5.8±7.8	40.3±116.4	0.08
Macroalbuminuria (%)	NA	3.5	NA
Microalbuminuria (%)	NA	12.3	NA
Retinopathy (%)	NA	5.2	NA

BMI: Bone mass index, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, CRP-US: C Reactive protein, LDLc: Low density lipoprotein cholesterol, HDLc: High density lipoprotein cholesterol.

Data presented are mean ± SD or percent as indicated, p\* < 0.05. \*By Student t-Test or Chi-Squared and \*\*by Mann-Whitney.

**Table 2 - Clinical and biochemical characteristics of T1DM patients with and without endothelial dysfunction**

	T1DM		p
	ED N=28	N-ED N=29	
Age (years)	17.4±3.4	18.0±3.9	0.54
Gender (Male/Female)(%)	39.3/60.7	51.3/48.7	0.33
Duration of disease (months)	105.4±74.7	66.3±48.0	0.02
Previous Confirmed Ketoacidosis (%)	15/28 (53.6)	11/29 (37.9)	0.23
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.4±2.53	22.4±2.57	0.99
Abdominal Waist (cm)	78.3±7.51	77.1±6.31	0.50
SBP (mmHg)	106.4±11.6	106.2±10.5	0.94
DBP (mmHg)	68.2±7.72	66.9±7.12	0.51
HbA1c (%)	8.97±1.85	8.23±1.45	0.10
Fasting Blood Glucose (mg/dl)	192.4±83.8	186.5±87.5	0.80
CRP-US (mg/l)	2.16±2.98	1.74±1.85	0.52
Total Cholesterol (mg/dl)	166.9±40.9	158.6±27.9	0.37
LDLc (mg/dl)	95.4±32.4	90.8±26.4	0.56
HDLc (mg/dl)	56.8±13.5	55.7±14.7	0.79
Triglycerides (mg/dl)	83.8±59.4	72.3±29.7	0.34
Serum Creatinine (mg/dl)	0.76±0.14	0.79±0.19	0.52
Urinary albumin/creatinine (mg/g)	53.0±153.0	26.0±53.0	0.79
Microalbuminuria (%)	22.2	3.5	0.04
Retinopathy (%)	0.3	0.7	0.98

DKA: Diabetic ketoacidosis, BMI: Bone mass index, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, CRP-US: C Reactive protein, LDLc: Low density lipoprotein cholesterol, HDLc: High density lipoprotein cholesterol.

Data presented are mean ± SD or percent as indicated, p\* < 0.05. \*By Student t-Test or Chi-Squared and \*\*by Mann-Whitney.

**Table 3 – Clinical and biochemical characteristics of T1DM patients with less than 5 years of disease with and without endothelial dysfunction**

	T1DM		p
	ED N=10	N-ED N=18	
Age (years)	15.6±2.0	17.5±3.62	0.14
Gender (Male/Female)(%)	50	50	0.99
Duration of disease (months)	36.2±14.9	34.0±12.6	0.69
% of patients with confirmed DKA	40.0	27.7	0.50
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2±2.7	21.5±2.4	0.46
Abdominal Waist (cm)	76.7±2.37	75.1±1.49	0.55
SBP (mmHg)	110.0±11.5	103.3±10.8	0.14
DBP (mmHg)	70.0±8.2	65.0±5.1	0.56
HbA1c (%)	8.2±0.9	8.0±1.4	0.67
Fasting Blood Glucose (mg/dl)	185.8±85.9	177.3±78.3	0.79
CRP-US (mg/l)	1.38±0.84	1.18±0.92	0.58
Total Cholesterol (mg/dl)	159.4±45.3	156.9±29.5	0.86
LDLc (mg/dl)	96.2±38.0	88.6±25.5	0.53
HDLc (mg/dl)	52.1±13.0	54.6±14.2	0.64
Triglycerides (mg/dl)	71.2±8.9	68.2±6.5	0.78
Serum Creatinine (mg/dl)	0.70±0.14	0.77±0.17	0.26
Urinary albumin/creatinine (mg/g)	100±25.6	26±50.0	0.33
Nephropathy (Micro+Macro) (%)	0.20	0.11	0.39
Microalbuminuria (%)	0.20	0.05	0.26
Macroalbuminuria (%)	0	0.05	0.63
Retinopathy (%)	0	0.11	0.55

DKA: Diabetic ketoacidosis, BMI: Bone mass index, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, CRP-US: C Reactive protein, LDLc: Low density lipoprotein cholesterol, HDLc: High density lipoprotein cholesterol.

Data presented are mean ± SD or percent as indicated, p\* < 0.05. \*By Student t-Test or Chi-Squared and \*\*by Mann-Whitney.

**Table 4 –Flow-mediated dilation and nitrate-mediated dilation and vascular parameters in T1DM patients and non-diabetic subjects**

Vascular Parameters	Non-DM (n=10)	All Type 1 DM			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
		ED (n=28)	N-ED (n=29)	All (n=57)				
Baseline Diameter <sub>1</sub> (mm)	0.312 ± 0.053	0.307 ± 0.044	0.305 ± 0.052	0.306±0.048	0.96	0.93	0.99	0,72
Post -Occlusion Diameter (mm)	0.357 ± 0.053	0.321 ± 0.047	0.347 ± 0.056	0.334± 0.053	0.17	0.87	0.16	0,21
Flow Mediated Dilation (%)	14.56 ± 5.59	4.57 ± 2.89	13.72 ± 5.82	9,22± 6,50	0.00*	0.89	0.00*	0.02 <sup>#</sup>
Baseline Diameter <sub>2</sub> (mm)	0.315 ± 0.052	0.306 ± 0.045	0.311 ± 0.053	0.309± 0.049	0.87	0.98	0.91	0,69
Post- Nitrate Diameter (mm)	0.406 ± 0.058	0.370 ± 0.043	0.381 ± 0.046	0.376± 0,044	0.12	0.35	0.69	0,06
Nitrate Mediated Dilation (%)	29.31 ± 4.20	21.7 ± 7.6	23.6 ± 10.6	22,26± 9,2	0.07	0.21	0.72	0,02 <sup>#</sup>
	Non-DM	Only Type 1 DM <5 years			P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>
	(n=10)	ED (n=10)	N-ED (n=18)	All (n=28)				
Baseline Diameter <sub>1</sub> (mm)	0.312 ± 0.053	0.316±0.037	0.300±0.054	0.305±0.049	0.98	0.82	0.73	0.72
Post -Occlusion Diameter (mm)	0.357 ± 0.053	0.325±0.044	0.343±0.058	0.337±0.054	0.42	0.81	0.69	0.31
Flow Mediated Dilation (%)	14.56 ± 5.59	3.02±2.96	14.3±6.30	10.28±7.64	0.000*	0.99	0.000*	0.11
Baseline Diameter <sub>2</sub> (mm)	0.315 ± 0.052	0.312±0.039	0.307±0.058	0,315±0.05	0.99	0.92	0.96	0.73
Post -Nitrate Diameter (mm)	0.406 ± 0.058	0.378±0.047	0.384±0.048	0.382±0.04	0.46	0.54	0.95	0.19
Nitrate Mediated Dilation (%)	29.3 ± 4.2	21.1±5.59	26.6±11.2	24.6±9.84	0.11	0.73	0.27	0.16

P<sub>1</sub>: DE vs Control; P<sub>2</sub>: N-DE vs Control; P<sub>3</sub>: N-DE vs DE; P<sub>4</sub>: Control vs All Type 1 DM  
 Data presented are mean±SD, p < 0.05. By Anova and Scheffe.

**Table 5A - Pearson's correlation between flow-mediated dilation (FMD) and HbA1c at different moments from the vascular test in T1DM patients.**

Correlation between Flow Mediated Dilation vs HbA				
HbA1c	T1DM<5 years n=28		All Patients n=57	
	r	p	r	p
At the vascular test	-0.122	0.54	-0.128	0.34
3 months	- 0.104	0.62	-0.130	0.35
6 months	- 0.130	0.52	-0.152	0.26
9 months	-0.158	0.43	-0.118	0.39
12 months	-0.419	0.03*	-0.239	0.08
15 months	-0.437	0.03*	-0.303	0.02*
18 months	-0.241	0.28	-0.188	0.20
24 months	-0.291	0.22	-0.168	0.26
Mean of Period 1 (0-12months)	-0.286	0.15	-0.181	0.18
Mean of Period 2 (12-24months)	-0.426	0.02*	-0.289	0.03*

p\* < 0.05

**Table 5B - Historical HbA1c in T1DM patients with and without ED**

HbA1c	Only T1DM<5 years			All TDM1 patients		
	ED (n=10)	N-ED (n=18)	p	ED (n=28)	N-ED (n=29)	p
0	8.20±0.94	7.99±1.37	0.66	8.97±1.85	8.23±1.44	0.10
3 mo	8.19±1.00	8.01±1.40	0.74	9.11±1.99	8.25±1.45	0.07
6 mo	8.22±1.00	8.36±1.86	0.83	9.35±2.05	8.55±1.71	0.12
9 mo	8.49±0.86	8.15±1.97	0.61	9.37±2.21	8.56±1.95	0.17
12 mo	9.55±2.59*	7.99±1.01	0.03	9.52±2.31*	8.29±1.35	0.02
15 mo	8.33±1.09	7.64±1.41	0.22	8.99±1.64*	8.03±1.47	0.03
18 mo	8.72±1.49	8.13±2.45	0.53	9.20±2.18	8.29±2.13	0.15
24 mo	9.34±1.81	7.97±1.86	0.11	9.63±2.24*	8.36±1.87	0.04
Mean HbA1c 0-12m	8.61±0.86	8.13±1.34	0.32	9.32±1.81*	8.42±1.41	0.04
Mean HbA1c 12-24m	9.57±2.42	8.08±1.36	0.05	9.53±2.09*	8.35±1.39	0.01

Data presented are mean±SD, p < 0.05. By Student t- Test

**Table 6 - Intensive self monitoring blood glucose (SMBG)**

<b>SMBG Variability</b>	<b>T1DM</b>		<b>P*</b>
Blood Glucose (mg/dl)	ED	N-ED	
Fasting	151.85	140.50	0.23
SD	63.74	52.79	0.06
2h breakfast	186.0	179.17	0.62
SD	57.13	53.52	0.71
Pre-Lunch	185.21	151.86	0.22
SD	70.84	62.75	0.18
2h after lunch	155.51	166.25	0.39
SD	57.88	58.16	0.97
Pre-Dinner	186.26	171.96	0.24
SD	76.54	76.87	0.88
2h after dinner	196.82	165.25	0.05
SD	72.54	79.66	0.84
3 am	168.22	144.38	0.11
SD	60.07	49.47	0.30
Mean Blood Glucose (Whole period)	163.85	160.22	0.15
Mean SD (Whole period)	58.37	46.38	0.53

Data presented are mean $\pm$ SD, p < 0.05. By Student t- Test



Figure 1 - Flow-mediated dilation and nitrate-mediated dilation of type1 patients and non-diabetic subjects

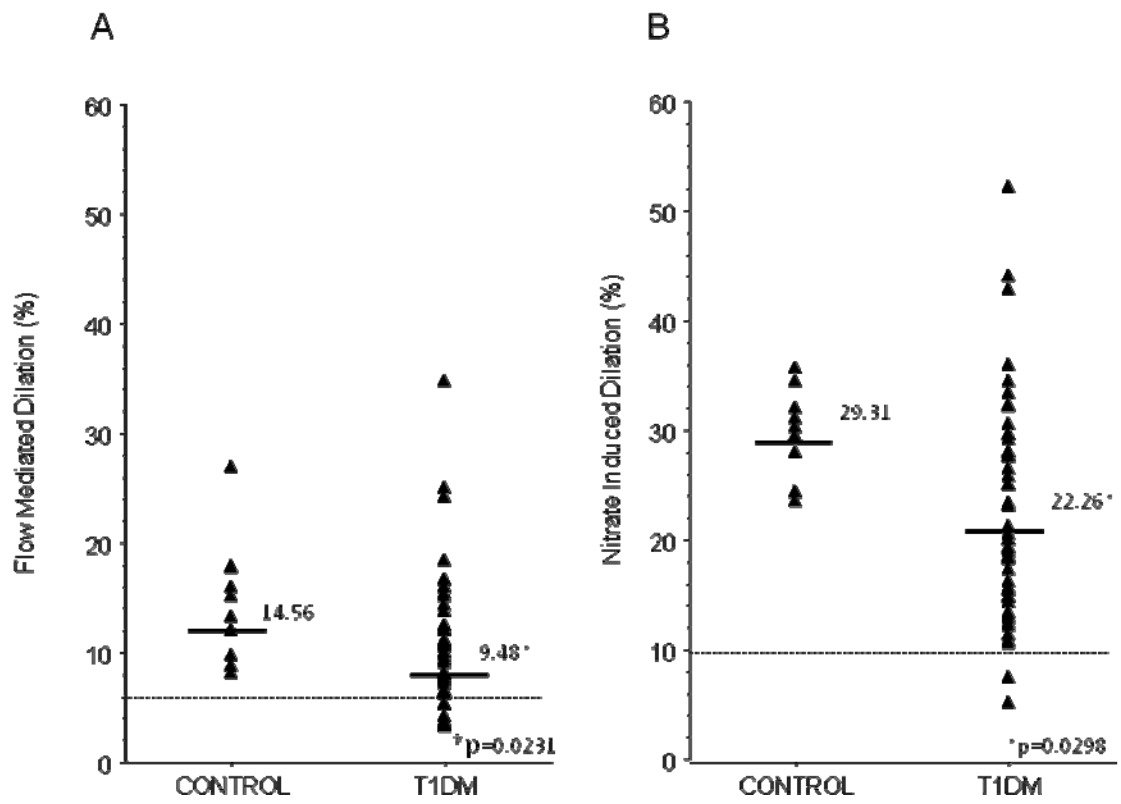
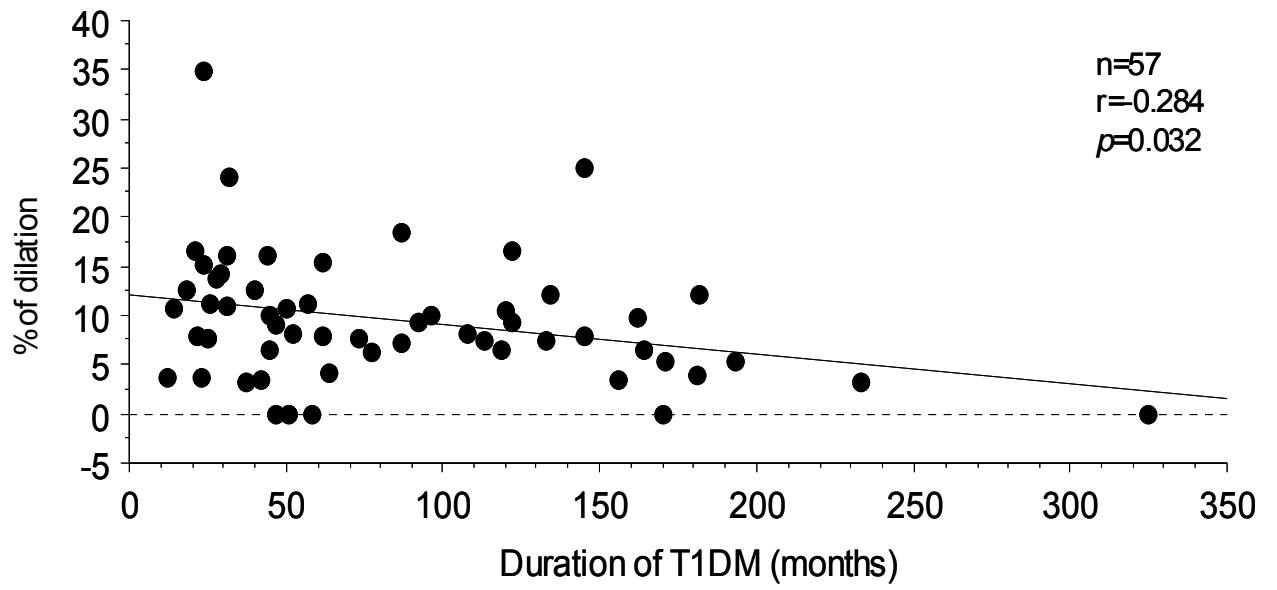
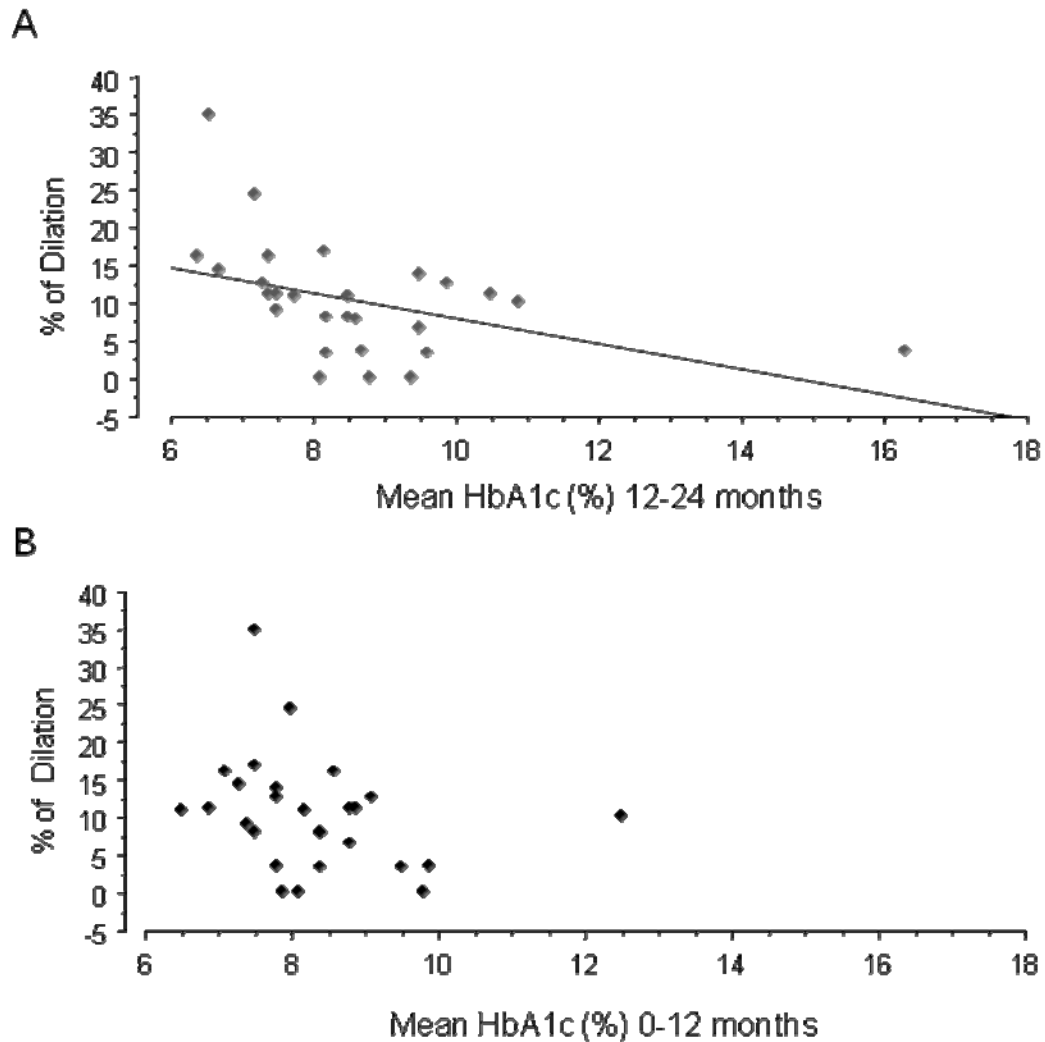


Figure 2 - Pearson's Correlation between duration of T1DM and presence of endothelial dysfunction



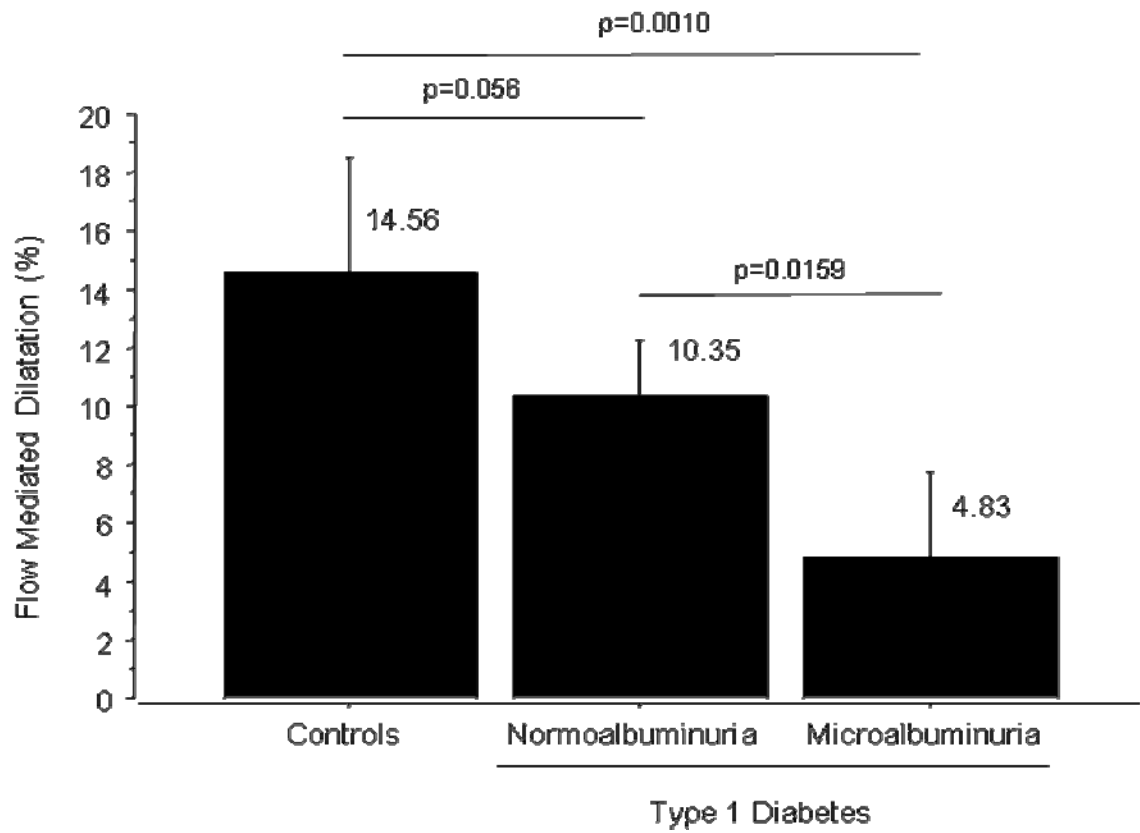
**Figure 3 - Pearson's Correlation between flow-mediated dilation (expressed as % of dilation from baseline) and mean HbA1c obtained 12 to 24 months before ultra-sound (long-term control) (A) and from the day of ultra-sound to 12 months before the ultrasound analysis (short-term control) (B), in adolescents with Type 1 diabetes with less than 5 years of disease (n=28).**



Graphic A:  $r = -0.426$ ,  $p = 0.02$

Graphic B:  $r = -0.286$ ,  $p = 0.15$

Figure 4 – Flow-mediated dilatation (%) in adolescents with Type 1 diabetes with (n=7) or without microalbuminuria (n=50) and non-diabetics controls (n=10). Data are mean and standard deviation. ANOVA with Bonferroni.



---

## ***CONSIDERAÇÕES GERAIS***

---

## 7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O estudo realizado demonstrou que adolescentes e adultos jovens com DM1 apresentam valores de DMF significativamente menores em relação a indivíduos com a mesma faixa etária e sem DM1. Ainda, nos pacientes com DM1, 49% deles apresentaram DE (DMF inferior a 8,1%) e, no sub-grupo com menos de 5 anos de DM1, 36%.

A DE mostrou-se negativamente correlacionada ao tempo de DM, o que está de acordo com a literatura, onde a DE é encontrada com mais frequência após a primeira década de diagnóstico do DM. No presente estudo, a presença de DE em um grupo significativo de pacientes com diagnóstico há menos de 5 anos, reflete ser a mesma um fenômeno precoce na história natural do DM1.

O controle metabólico histórico foi outro determinante importante para a presença de DE, principalmente nos 12-24 meses que antecederam a avaliação vascular, ao contrário do controle metabólico recente, avaliado pela medida de HbA1c no momento da DMF. Em concordância com esta observação, não encontramos nenhuma correlação com o percentual de DMF e a média das glicemias capilares pré e pós prandiais nos 30 dias que antecederam o exame.

A microalbuminúria também se mostrou associada à DE. A prevalência maior de microalbuminúria nos pacientes com DE em relação aos sem DE foi um achado significativo. Além disso, os pacientes com microalbuminúria apresentaram valores mais baixos de DMF. A presença de DE em pacientes sem microalbuminúria, especialmente nos pacientes com menos de 5 anos de DM, indica que esta pode ocorrer antes do aparecimento de complicações crônicas do DM, como a nefropatia.

Ainda, o achado de valores de Dilatação pós nitrato significativamente menores nos pacientes com DM1 em relação aos controles não diabéticos, pode refletir certo grau de disfunção de músculo liso vascular e chamar a atenção para um fenótipo mais propenso à aterosclerose. Estudos longitudinais são necessários para confirmar esses achados.





## 8. ANEXOS

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO - A

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa que visa estudar as alterações precoces que podem ocorrer nas artérias de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1. Sabe-se que o processo de aterosclerose pode iniciar cedo, principalmente quando associado ao diabetes. Detectando estas alterações iniciais podemos saber se adolescentes e adultos jovens com Diabetes tipo 1 apresentam maior risco de desenvolver doença cardiovascular no futuro para que se tome medidas preventivas para evitá-las.

**Se você foi convidado para participar é porque você consulta no Instituto da Criança com Diabetes e apresenta diagnóstico de Diabetes tipo 1 em condições para entrar no estudo.**

A participação é simples. Você deverá comparecer ao **Instituto da Criança com Diabetes** para uma **consulta médica especial**, quando **será examinado para ver sua pressão arterial, peso, altura e cintura abdominal**. Neste mesmo dia, será feita **coleta de sangue (12 ml) em jejum de 12 horas**, para **exames laboratoriais de rotina anual no ICD como de glicemia e colesterol, hemoglobina glicada** e para análise de uma substância chamada **proteína c reativa**, realizada através da veia do braço e uma **coleta de urina (10 ml)**. O material utilizado é descartável, portanto, não há nenhum risco de transmissão de doenças.

Em outro dia a ser agendado pelo pesquisador, o paciente deverá comparecer ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre para fazer **ecografia da artéria do braço**, que será realizada por um profissional experiente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A ecografia **não é um procedimento invasivo**, portanto não lhe causará nenhum desconforto.

Neste exame, você **ficará deitado, confortavelmente, durante 45 minutos**. Primeiramente, será colocado no seu braço um manguito de pressão e um aparelho para medir a dilatação da artéria, quando esse manguito apertar, levemente o braço, por um período de 5 minutos. Você poderá sentir, neste momento, uma pequena sensação de “formigamento” no braço. Quando o manguito for desinsuflado essa sensação irá desaparecer completamente.

Logo após será aplicado um **spray de nitroglicerina na dose de 0,3 mg em baixo de sua língua** e novamente será medida a dilatação da artéria do braço. Você poderá sentir um gosto amargo na boca e leve e passageira dor de cabeça, logo após a aplicação do spray. Estes exames já foram feitos muitas vezes no laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo extremamente seguros. **A sua pressão arterial também será continuamente verificada através do aparelho de pressão colocado no braço contrário ao do exame.**

Os exames aos quais você está sendo submetido, não trarão benefício imediato, mas poderão auxiliar a ciência a entender melhor como as diferentes reações dos vasos sanguíneos podem se relacionar com o Diabetes e doenças cardiovasculares futuras.

Você poderá desistir de fazer os exames a qualquer momento, mesmo após terem começado, e isso não vai lhe trazer nenhum prejuízo à continuidade da assistência prestada pela equipe de saúde deste hospital. Os resultados obtidos serão

divulgados, mas seu anonimato será garantido, assim como nossa ética profissional exige.

**Não haverão despesas pessoais para você ou para seu familiar** em qualquer fase desta pesquisa, incluindo exames e consultas. Também **não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.**

A responsabilidade deste projeto é da **Dra. Gislaine Vissoky Cé** sob a supervisão do **Professor Dr. Marcello Bertoluci**, que desde já coloca-se à disposição para tirar todas as dúvidas no ICD, situado na Rua Álvares Cabral, 529 (segundas e quartas-feiras das 8-12h e terças, quintas e sextas-feiras das 14-17horas no tel. 33414511) ou através do e-mail [givissoky@hotmail.com](mailto:givissoky@hotmail.com). Poderei entrar em contato com Dr Júlio Baldisserotto, coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 33572407.

Eu..... responsável legal pelo paciente..... estou ciente das características deste estudo e autorizo meu familiar a participar desta pesquisa. Estou ciente que deverei responder a um questionário em nome de meu familiar e que deverei ir com o mesmo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para que realize ecografia da artéria do braço.

---

Porto Alegre, ..... de.....de .....

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO- B

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa que visa estudar as alterações precoces que podem ocorrer nas artérias de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1. Sabe-se que o processo de aterosclerose pode iniciar cedo, principalmente quando associado ao diabetes. Detectando estas alterações iniciais podemos saber se adolescentes e adultos jovens com Diabetes tipo 1 apresentam maior risco de desenvolver doença cardiovascular no futuro para que se tome medidas preventivas para evitá-las.

**Se você foi convidado para participar é porque você não apresenta Diabetes e está em condições para entrar no estudo.**

A participação é simples. Você deverá comparecer ao **Instituto da Criança com Diabetes** para uma **consulta médica especial**, quando **será examinado para ver sua pressão arterial, peso, altura e cintura abdominal**. Neste mesmo dia, será feita **coleta de sangue (12ml) em jejum de 12 horas**, para **exames laboratoriais como glicemia, colesterol hemoglobina glicada e** para análise de uma substância chamada **proteína c reativa**, realizada através da veia do braço e uma **coleta de urina (10 ml)**. O material utilizado é descartável, portanto, não há nenhum risco de transmissão de doenças.

Em outro dia a ser agendado pelo pesquisador, você deverá comparecer ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre sem necessidade de jejum para fazer **ecografia da artéria do braço**, que será realizada por um profissional experiente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A ecografia **não é um procedimento invasivo**, portanto não lhe causará nenhum desconforto.

Neste exame, você **ficará deitado, confortavelmente, durante 45 minutos**. Primeiramente, será colocado no seu braço um manguito de pressão e um aparelho para medir a dilatação da artéria, quando esse manguito apertar, levemente o braço, por um período de 5 minutos. Você poderá sentir, neste momento, uma pequena sensação de “formigamento” no braço. Quando o manguito for desinsuflado essa sensação irá desaparecer completamente.

Logo após será aplicado um **spray de nitroglicerina na dose de 0,3 mg em baixo de sua língua** e novamente será medida a dilatação da artéria do braço. Você poderá sentir um gosto amargo na boca e leve e passageira dor de cabeça, logo após a aplicação do spray. Estes exames já foram feitos muitas vezes no laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo extremamente seguros. **A sua pressão arterial também será continuamente verificada através do aparelho de pressão colocado no braço contrário ao do exame.**

Os exames aos quais você está sendo submetido, não trarão benefício imediato, mas poderão auxiliar a ciência a entender melhor como as diferentes reações dos vasos sanguíneos podem se relacionar com o Diabetes e doenças cardiovasculares futuras.

Você poderá desistir de fazer os exames a qualquer momento, mesmo após terem começado, e isso não vai lhe trazer nenhum prejuízo à continuidade da assistência

prestada pela equipe de saúde deste hospital. Os resultados obtidos serão divulgados, mas seu anonimato será garantido, assim como nossa ética profissional exige.

**Não haverá despesas pessoais para você ou para seu familiar** em qualquer fase desta pesquisa, incluindo exames e consultas. Também **não haverá compensação financeira relacionada a sua participação.**

A responsabilidade deste projeto é da **Dra. Gislaine Vissoky Cé** sob a supervisão do **Professor Dr. Marcello Bertoluci**, que desde já coloca-se à disposição para tirar todas as dúvidas no ICD, situado na Rua Álvares Cabral, 529 (segundas e quartas-feiras das 8-12h e terças, quintas e sextas-feiras das 14-17horas no tel. 33414511) ou através do e-mail givissoky@hotmail.com. Poderei entrar em contato com Dr Júlio Baldisserotto, coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 33572407.

Eu..... ou responsável legal de..... estou ciente das características deste estudo e autorizo meu familiar a participar desta pesquisa. Estou ciente que deverei responder a um questionário em nome de meu familiar e que deverei ir com o mesmo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para que realize ecografia da artéria do braço.

---

f

Porto Alegre, ..... de.....de .....

## FICHA CLÍNICA

### CADASTRO

NOME: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ anos ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

SEXO: ( ) M ( ) F CIDADE: \_\_\_\_\_ TELEFONE: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

### DADOS ANTROPOMÉTRICOS

P: \_\_\_\_\_ A: \_\_\_\_\_

IMC: \_\_\_\_\_ C.A: \_\_\_\_\_

PA: \_\_\_\_\_ mmHg

ESTAGIO PUBERAL: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### ESQUEMA DE INSULINA

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

TEMPO DE DM: \_\_\_\_\_

ATIVIDADE FÍSICA: \_\_\_\_\_

### COMPLICAÇÕES DO DM

1. \_\_\_\_\_ ( \_\_/\_\_/\_\_ )

2. \_\_\_\_\_ ( \_\_/\_\_/\_\_ )

3. \_\_\_\_\_ ( \_\_/\_\_/\_\_ )

4. \_\_\_\_\_ ( \_\_/\_\_/\_\_ )

5. \_\_\_\_\_ ( \_\_/\_\_/\_\_ )

### CO-MORBIDADES

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### HISTÓRIA FAMILIAR

DAC

DISLIPIDEMIA

NEFROPATIA

HAS

\_\_\_\_\_

## AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL ARTERIAL

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

PA inicial: \_\_\_\_\_

FC inicial: \_\_\_\_\_

PA final: \_\_\_\_\_

FC final: \_\_\_\_\_

Medida	Basal 1	Pós-oclusão (HR)	Basal 2	Pós Nitrato
1.				
2.				
3.				
1.				
2.				
3.				
1.				
2.				
3.				
Médias				

Glicemias capilares

**TABELA PARA PERFIL GLICÊMICO**

Mês:

Nome do Paciente.:

Dia	Café		Almoço		Jantar		3 hs	Observações
	Pré	2 hs Pós	Pré	2 hs Pós	Pré	2 hs Pós		
<input type="checkbox"/> 1								
<input type="checkbox"/> 2								
<input type="checkbox"/> 3								
<input type="checkbox"/> 4								
<input type="checkbox"/> 5								
<input type="checkbox"/> 6								
<input type="checkbox"/> 7								
<input type="checkbox"/> 8								
<input type="checkbox"/> 9								
<input type="checkbox"/> 10								
<input type="checkbox"/> 11								
<input type="checkbox"/> 12								
<input type="checkbox"/> 13								
<input type="checkbox"/> 14								
<input type="checkbox"/> 15								
<input type="checkbox"/> 16								
<input type="checkbox"/> 17								
<input type="checkbox"/> 18								
<input type="checkbox"/> 19								
<input type="checkbox"/> 20								
<input type="checkbox"/> 21								
<input type="checkbox"/> 22								



<input type="checkbox"/> 23								
<input type="checkbox"/> 24								
<input type="checkbox"/> 25								
<input type="checkbox"/> 26								
<input type="checkbox"/> 27								
<input type="checkbox"/> 28								
<input type="checkbox"/> 29								
<input type="checkbox"/> 30								
<input type="checkbox"/> 31								