

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA ESTÃO AUMENTADOS EM PACIENTES
COM DIABETES MELLITUS TIPO 2
E NEFROPATIA DIABÉTICA

CLAUDETE MARIA ZANATTA

Porto Alegre, janeiro de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**

ENDOCRINOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA ESTÃO AUMENTADOS EM PACIENTES

COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

E NEFROPATIA DIABÉTICA

CLAUDETE MARIA ZANATTA

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Canani

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Gross

Porto Alegre, janeiro de 2005

Z27n Zanatta, Claudete Maria

Níveis séricos de endotelina estão aumentados em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e nefropatia diabética / Claudete Maria Zanatta ; orient. Luís Henrique Canani ; co-orient. Jorge Luiz Gross. – 2005.

50 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Diabetes mellitus tipo II 2. Endotelina-1 3. Endotelinas 4. Nefropatias diabéticas I. Gross, Jorge Luiz II. Canani, Luís Henrique III. Título.

NLM: WK 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Rodrigo e Lívia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Luís Henrique Canani pelo exemplo, entusiasmo e dedicação à pesquisa, participação ativa em todos os passos na elaboração deste projeto e incansável estímulo nos momentos difíceis, e ao Prof. Dr. Jorge Luiz Gross pela sugestão do tema e importantes contribuições ao projeto.

À Profa. Dra. Sandra Pinho Silveiro, pelo exemplo profissional e pelas importantes contribuições na revisão do artigo de introdução.

Aos colegas de mestrado Fernando Gerchman e Cristiane Bauermann Leitão pela amizade, disponibilidade e ajuda na execução deste projeto.

Aos alunos da iniciação científica Lucas Burtet e Gustavo Nabinger pelo interesse, dedicação e auxílio em várias etapas deste projeto.

A Farm. Dr^a. Maria Caroline Broch pela disponibilidade e auxílio na dosagem da endotelina-1 e proteína C reativa.

À minha família, pelo apoio nas decisões difíceis, e pela alegria diante minhas conquistas.
Ao meu filho Rodrigo, acadêmico de medicina, que muito me orgulha e minha filha Lívia,

dedicada e brilhante nas suas tarefas escolares, pela ausência em momentos importantes de suas vidas, para que eu pudesse me dedicar ao meu crescimento pessoal.

À Roseli Braun pela amizade, paciência e principalmente pelo amparo aos meus filhos nos momentos em que estive ausente, presença fundamental para que pudesse me dedicar a esse projeto.

Ao PPG em Endocrinologia e ao GPPG do HCPA por disponibilizarem os meios para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, FAPERGS, PRONEX e FIPE/HCPA pelo apoio financeiro deste projeto.

A todas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, pois são eles que nos instigam à pesquisa.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Lista de tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de quadros	x
Lista de abreviaturas	xi

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Papel do Sistema Endotelina na Nefropatia Diabética

Resumo	14
Abstract	15
Introdução	16
Caracterização do sistema endotelina	17
Biologia molecular e fisiologia	18
Endotelina-1	19
Efeito da endotelina-1 na nefropatia diabética	20
Estudos genéticos	23
Conclusões	23
Referências bibliográficas	24
Objetivos	33

Capítulo 2

Endothelin-1 levels are increased in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy

Abstract	35
Introduction	36
Research design and Methods	37
Subjects evaluation	37
Laboratory evaluation	38
Statistical analysis	39
Results	39
Conclusion	41
References	44
Considerações finais	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Valores de albuminúria e de proteinúria utilizados no diagnóstico de nefropatia diabética	30
--	----

Capítulo 2

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of subjects according to renal status	47
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Ação da endotelina através dos receptores ET-B nas células endoteliais causando vasodilatação e através dos receptores ET-A e ET-B nas células do músculo liso vascular causando vasoconstrição	31
--	----

Capítulo 2

Figure 1: Plasma ET-1 level among the different renal status groups	48
--	----

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1:

Quadro 1: Fatores relacionados à expressão e síntese da ET-132

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	<i>Angiotensin conversor enzyme</i>
A1c	<i>A1c test</i>
Ang II	Angiotensina II
BMI	<i>Body mass index</i>
DM	Diabetes mellitus
DN	<i>Diabetic nephropathy</i>
ET-A	Receptor A da endotelina
ET-B	Receptor B da endotelina
ET-1	Endotelina 1
ET-2	Endotelina 2
ET-3	Endotelina 3
EUA	Excreção urinária de albumina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HOMA-ir	<i>Homeostasis model assessment</i>
hs-CRP	<i>High sensitivity C-reactive protein</i>
ND	Nefropatia diabética
MC	<i>Mesangial cells</i>
ND	<i>Nephropaty diabetic</i>
RAS	<i>Renin-angiotensin system</i>
SRA	Sistema renina angiotensina
VWF	fator de von Willebrand

UAER

Urinary albumin excretion rate

Papel do Sistema Endotelina na Nefropatia Diabética

“título abreviado”: endotelina e nefropatia diabética

Claudete Maria Zanatta¹

Sandra Pinho Silveiro¹

Jorge Luiz Gross¹

Luís Henrique Canani¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço para correspondência

Jorge L. Gross, Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4º andar, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: jorgegross@terra.com.br

Fone: + 55 51 21018127 Fax: + 55 51 2101 8777.

RESUMO

Nefropatia diabética (ND) é uma importante complicação crônica do diabetes mellitus (DM), sendo responsável por uma proporção importante dos novos casos de diálise. Os principais fatores de risco são a hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), a dislipidemia e o tabagismo. Está claro que a ND apresenta também um componente genético, entretanto os genes envolvidos na sua etiologia ainda não estão totalmente identificados. O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um importante papel na gênese e progressão da ND. Recentemente, acumulam-se evidências que endotelinas também podem participar na patogênese da ND. As endotelinas são peptídeos com potente ação vasoconstritora e atuam modulando o tono vasomotor, proliferação celular e produção hormonal. Estes peptídeos agem através de dois receptores (ET-A e ET-B) que são expressos nas células endoteliais e no músculo liso vascular. Ativação destes receptores nas células renais levam a uma complexa cascata de alterações resultando em proliferação e hipertrofia das células mesangiais, vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes e acúmulo da matriz extracelular. Essas alterações hemodinâmicas renais estão associadas com o aparecimento e progressão da doença renal no DM. Níveis plasmáticos elevados de endotelina-1 (ET-1) têm sido relatados em pacientes com DM, tanto com e sem microalbuminúria, sugerindo que a disfunção endotelial relacionada ao DM poderia aumentar a produção vascular de ET-1, que levaria ao dano glomerular. O uso de drogas antagonistas do receptor da ET-1 em situações de DM experimental tem mostrado propriedades nefroprotetoras, reforçando a importância deste sistema na ND.

Descritores: Endotelina, Diabetes Mellitus, Nefropatia Diabética

ABSTRACT

Diabetic Nephropathy (DN) is a major chronic complication of diabetes mellitus (DM). About 25 percent of patients starting dialysis had DN. The main risk factors for DN are hypertension, hyperglycemia, dyslipidemia and smoking, but it is clear that a genetic component is also involved. The renin-angiotensin system (RAS) has an important role in genesis and progression of DN. Recently, considerable evidence implicated endothelins in the pathogenesis of DN. Endothelins are potent vasoconstrictor peptides and act as modulators of vasomotor tone, cell proliferation and hormone production. Endothelins act through two types of receptors (ET-A and ET-B) and are expressed on endothelial cells and vascular smooth-muscle cells. Activation of this receptor in renal mesangial cells (MC) leads to a complex signaling cascade with resultant stimulation of MC hypertrophy, proliferation, contraction, and extracellular matrix accumulation. Elevated endothelin-1 (ET-1) level have been reported in patients with DM, either with or without microalbuminuria. It has been speculated that DM-related endothelial activation might increase the vascular production of ET-1, which in turn leads to glomerular damage. The use of ET receptor antagonists has been reported as renoprotective, correcting the early hemodynamic abnormalities in experimental DM, reinforcing the importance this system in the pathogenesis of DN.

Keywords: Endothelin-1, Diabetes Mellitus, Diabetic Nephropathy

INTRODUÇÃO

Nefropatia diabética (ND) é uma importante complicação do diabetes mellitus (DM), sendo responsável por aproximadamente um quarto dos casos iniciando diálise na região metropolitana de Porto Alegre, RS (1). Outros estudos relatam uma incidência ainda maior de ND nos pacientes em início de diálise chegando próximo a 50% (2). A ND acomete cerca de 30% dos pacientes com DM tipo 1, sendo a principal causa de morte nesse grupo e, em pacientes com DM tipo 2, sua prevalência varia de 20 a 50%, dependendo da origem étnica (3, 4). Os pacientes com ND apresentam maior mortalidade desde suas fases iniciais. Além disso, a sobrevida dos pacientes com DM em programas de hemodiálise é menor do que a sobrevida dos pacientes sem DM (1,5).

Didaticamente, a ND apresenta no seu curso clínico três etapas evolutivas: a fase de nefropatia incipiente (fase de microalbuminúria), a fase de nefropatia clínica (fase de macroalbuminúria) e a fase de insuficiência renal (tabela 1).

As alterações estruturais renais relacionadas à ND são caracterizadas por aumento da membrana basal glomerular, espessamento da membrana basal tubular, esclerose mesangial difusa, microaneurismas e arteriosclerose da camada hialina da íntima (6,7). Áreas de intensa expansão mesangial chamadas de nódulos de Kimmelstiel-Wilson ou expansão mesangial nodular são observadas em torno de 40 – 50% dos pacientes que desenvolvem proteinúria, e é uma alteração patognomônica da ND. Em fases mais avançadas da doença ocorre atrofia tubular e fibrose intersticial (8,9).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da ND são a hiperglicemia, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (10-12) e a predisposição genética (13-15). A dislipidemia, o tabagismo e a quantidade e origem das proteínas da dieta podem desempenhar um papel ainda não completamente definido. Nem todos os pacientes com DM vão desenvolver a ND, mesmo após anos de exposição à hiperglicemia. Esta observação em estudos epidemiológicos e de famílias indicam haver também fatores genéticos de predisposição e proteção ao desenvolvimento da ND (14-15).

O SRA parece ter um papel importante no desenvolvimento e progressão da ND (16-19). No entanto, achados recentes têm demonstrado que outros fatores relacionados ao SRA, como a aldosterona e o sistema endotelina, também têm um importante papel na instalação e progressão desta complicação (20,21). O objetivo desta revisão é abordar as evidências de uma possível contribuição do sistema endotelina na gênese da ND.

CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA ENDOTELINA

Endotelinas são peptídeos vasoconstritores representados pela endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). Estes peptídeos são produzidos em vários tecidos, onde atuam como moduladores do tônus vascular, proliferação celular e produção hormonal (20-22). Apenas a ET-1 é produzida pelas células endoteliais sendo, portanto, a que está relacionada à disfunção endotelial. A ET-1 é produzida, em menor proporção, pelas células vasculares do músculo liso, neurônios e astrócitos, células endometriais, células mesangiais dos rins, células de Sertoli e células epiteliais da mama e do pulmão (21). Estímulos como isquemia, hipóxia ou estresse vascular induzem em minutos a transcrição do RNA mensageiro, a síntese e a secreção da ET-1. Com isso, as células vasculares podem rapidamente ajustar a necessidade de ET-1 para regular o tônus vasomotor. Este peptídeo tem uma meia vida plasmática de 4 a 7 minutos e sofre metabolização de primeira passagem (80-90%) nos pulmões (21). A ET-1 é considerada um hormônio parácrino, visto que 75% de sua secreção é liberada no lado sub-luminal da célula, atuando diretamente no músculo liso vascular (20). Devido esta ação parácrina, sua concentração plasmática é muito baixa. Para dosagem da ET-1 sérica é necessária cuidadosa coleta da amostra para evitar degradação do peptídeo *in vitro*, técnica de extração segura e um método sensível para sua quantificação (22). Apesar dos baixos níveis séricos, vários estudos clínicos correlacionam os níveis da ET-1 sérica com a presença de diversas doenças, tais como DM tipo 2 e doenças do sistema cardiovascular, como HAS, doença cérebro-vascular,

insuficiência cardíaca congestiva e infarto agudo do miocárdio (23-27), assim como seu papel como marcador precoce de reoclusão após angioplastia coronariana (28).

A ET-2 é produzida predominantemente no rim e no intestino e em pequenas quantidades no miocárdio, placenta e útero (21). É o vasoconstritor mais potente dos três peptídeos. Em animais, ET-2 co-segrega com hipertensão sistólica (29), enquanto no ser humano seu papel não está bem esclarecido. A ET-3 é encontrada em altas concentrações no cérebro e em menor quantidade no trato gastrointestinal, pulmões e rins. Possivelmente regula importantes funções dos neurônios e dos astrócitos (30).

As endotelinas agem nos tecidos alvos através de dois receptores. O receptor do tipo A (ET-A) e o receptor do tipo B (ET-B), que pertencem a super família dos receptores da proteína G da membrana plasmática (20,21). Os receptores ET-A estão presentes em abundância nas células do músculo liso vascular e nos miócitos cardíacos. Estes apresentam afinidade 10 vezes maior para a ET-1 do que para as outras isoformas e é principalmente através destes receptores que a ET-1 age causando vasoconstrição. Os receptores ET-B são expressos predominantemente nas células endoteliais e em muito menor proporção nas células do músculo liso vascular (20,21). Estes apresentam a mesma afinidade para as três isoformas da endotelina (21).

BIOLOGIA MOLECULAR E FISILOGIA

O gene da ET-1 está localizado no cromossomo 6 (6p24.1) e contém 5 exons. O gene da ET-2 se localiza no cromossomo 1 (1p34) e contém 5 exons e o gene da ET-3 se localiza no cromossomo 20 (20q13.2 e 20q13.3) e contém 6 exons. O gene que codifica o receptor ET-A se localiza no cromossomo 4 (4q31.22) e contém 8 exons enquanto o que o gene do ET-B tem duas isoformas e localiza-se no cromossomo 13 (13q22) e tem 7 exons.

A expressão dos receptores da endotelina (ET-A e ET-B) é regulada em paralelo com a expressão da ET-1 (31). Fatores físicos, bioquímicos e humorais regulam a transcrição do gene da

ET-1 estimulando a síntese da pré-proendotelina-1, que contém 203 aminoácidos. Este pré-hormônio é então transformado em *big* endotelina-1, pelas endopeptidases, em um fragmento de 39 aminoácidos, que é a forma circulante no plasma, mas que é funcionalmente inativa. As enzimas de conversão da endotelina, quimases e metaloproteases clivam a *big*-endotelina entre as posições 21 (triptofano) e 22 (valina) na forma ativa da ET-1 com 21 aminoácidos (21).

Em situações de hipóxia, ocorre estímulo para produção de ET-1 e do receptor ET-A nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular concomitantemente. A ativação dos receptores da ET-A estimula a hidrólise da fosfolipase C que leva ao aumento do cálcio intracelular, causando vasoconstrição e ativando a proteína C quinase que resulta na proliferação tecidual (20,21). A vasoconstrição persiste após a ET-1 ser removida do receptor, provavelmente devido à concentração de cálcio intracelular permanecer elevada. A presença de óxido nítrico encurta o período de vasoconstrição por acelerar o retorno do cálcio intracelular ao valor basal (21).

O receptor ET-B está presente em maior quantidade nas células endoteliais e a sua ativação causa liberação de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico e a prostaciclina, levando a uma vasodilatação inicial, seguida por vasoconstrição (31). Este receptor é encontrado em menor proporção nas células do músculo liso vascular, onde sua ativação causa vasoconstrição (figura 1).

ENDOTELINA-1

Das três endotelinas, a ET-1 é a principal representante do sistema endotelina relacionada a distúrbios hemodinâmicos e de disfunção endotelial. A ET-1 e o receptor ET-A têm provavelmente um importante papel na manutenção do tônus vasomotor basal (32). Esta endotelina tem efeito vasoconstritor 100 vezes maior que a norepinefrina, sendo um dos mais potentes vasoconstritores já identificado (21). Este efeito é mediado principalmente pela ativação do receptor da ET-A nas células do músculo liso vascular (33). A ET-1 também potencializa a vasoconstrição causada pela norepinefrina e catecolaminas, que por sua vez, estimulam a produção de ET-1 (34).

A ET-1 interage com outros fatores vasoativos vasculares. Sua produção é estimulada por vários hormônios, peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e condições de estresse da parede dos vasos. Substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico e prostaciclina inibem a sua produção (21) (quadro 1).

O endotélio dos vasos regula o tônus e o crescimento vascular através de um equilíbrio entre fatores de relaxamento e de contração. As ações mitogênicas e vasoconstritoras da ET-1 são contrabalançadas por fatores vasodilatadores e anti-crescimento como as prostaciclina e o fator de relaxamento derivado do endotélio (35). Alterações metabólicas que estão presentes no DM, como, o hiperinsulinismo, a hiperglicemia e a hiperlipidemia, estimulam diretamente a liberação da ET-1 pelas células endoteliais e a expressão de seus receptores (20). A exposição prolongada das células endoteliais e do músculo liso vascular a alterações metabólicas do DM promove aterosclerose e outras alterações morfológicas nos vasos, que indiretamente afetam a liberação e a ação da ET-1 em vários órgãos alvo (20). Vários estudos têm descrito níveis séricos aumentados de ET-1 em pacientes com DM (23-25) e em estados de resistência à insulina (26,27). Além disso, o uso de antagonistas dos receptores da ET-1 melhora a resposta vasodilatadora em pacientes com HAS (36-38). Em modelos de animais diabéticos, estes fármacos apresentam efeito protetor no desenvolvimento e progressão da ND (39-41).

EFEITO DA ET-1 NO DESENVOLVIMENTO DA NEFROPATIA DIABÉTICA

O rim é um importante local de produção e também é alvo da ação da ET-1. As células mesangiais são as principais células que produzem e sofrem ação da ET-1 no rim (42), entretanto, as células epiteliais glomerulares e tubulares também produzem ET-1 (43). Os receptores ET-A estão presentes nas artérias arqueadas e vasa recta e os receptores ET-B são encontrados predominantemente nos ductos coletores, sugerindo diferentes papéis na reabsorção de sal e água. Ambos receptores são encontrados no glomérulo (31).

Os efeitos hemodinâmicos da ET-1 no rim são aumentar a resistência vascular renal por vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes e artérias arqueadas e interlobulares. Conseqüentemente há redução do fluxo sanguíneo, taxa de filtração glomerular e inibição da reabsorção de sal e de água. A ET-1 também causa proliferação celular glomerular e acúmulo de proteínas na matriz extra-celular (31). Administração sistêmica de ET-1 reduz a taxa de filtração glomerular e pode causar natriurese, um mecanismo que provavelmente está relacionado ao efeito do receptor ET-A (45).

Como descrito anteriormente, existe interação da ET-1 com outras substâncias vasoativas, como a angiotensina II (Ang II). Por exemplo, a Ang II estimula a hipertrofia cardíaca (46,47). A inibição da produção de Ang II, estimulada pela ET-1 ou a inibição da ação da ET-1 pode prevenir a hipertrofia cardíaca (48,49). A Ang II, reconhecidamente relacionada à ND, tem sido identificada como um potente estimulador da secreção de ET-1 (37) e alguns de seus efeitos são dependentes de um maior estímulo da ET-1 (36). Em culturas de células mesangiais renais, a síntese de matriz protéica induzida pela ET-1 pode ser prevenida com o uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina e, no tecido vascular, o efeito da Ang II é atenuado pelo uso de antagonistas da ET-1 (38). Estas evidências mostram uma importante inter-relação destas duas substâncias vasoconstritoras na lesão renal.

Recentes estudos têm discutido o papel da ET-1 na fase inicial da ND. Níveis plasmáticos elevados de ET-1 foram encontrados em pacientes com DM tipo 2, independente da presença de doença microvascular, porém os pacientes com DM e microalbuminúria tinham níveis de ET-1 significativamente mais elevados do que normoalbuminúricos e hipertensos sem DM (25). Por outro lado, um estudo prévio com pequeno número de pacientes mediu os níveis séricos de ET-1 em pacientes com DM microalbuminúricos, macroalbuminúricos e controles (sem DM). Encontrou níveis significativamente mais elevados apenas no grupo com macroalbuminúria (50).

A atividade da ET-1 endógena no receptor ET-A (51) e a produção renal de ET-1 está aumentada em indivíduos com DM (25). Também foi observado que a expressão do gene da ET-1 está aumentado em rins de ratos diabéticos, assim como em culturas de células mesangiais de ratos expostas a altas concentrações de glicose (52). Estes achados reforçam a hipótese de que ativação precoce do endotélio vascular levaria a um aumento da produção e expressão de ET-1 e isso favoreceria o início da microalbuminúria (25). Estes achados são reforçados por um estudo que avaliou a função endotelial em pacientes com DM tipo 1 através da dosagem seriada de fator de von Willebrand (vWF) por um período de 64 meses. Neste estudo foi demonstrado que a disfunção endotelial, estimada pelo nível plasmático do fator de vWF, precedeu o início de microalbuminúria em 3 anos (53).

Estudos em modelos animais demonstram que ocorre normalização da pressão glomerular e diminuição de deposição de proteínas na matriz extracelular, assim como diminuição da excreção urinária de albumina com o uso do bloqueador do receptor ET-A/ ET-B (bosentan) (40). Nestes animais, o uso do bosentan apresentou um efeito nefroprotetor, corrigindo tanto a hiperfiltração inicial, como a evolução para nefropatia clínica (41). Hocher et al (54) estudaram o uso de antagonista seletivo do ET-A (LU 135252) em comparação com antagonista combinado ET-A/ET-B (LU 224332) em ratos e mostraram que os dois antagonistas normalizaram a expressão da fibronectina e colágeno tipo IV dentro do glomérulo que estava aumentada após 36 semanas da indução do DM, e reduziram em 50% a proteinúria em relação aos controles. O efeito antifibrótico parece ser mediado via receptor ET-A. Um estudo em pacientes com DM tipo 2 obesos, com resistência à insulina mostrou melhora da vasodilatação endotélio dependente com o uso do bloqueador do ET-A (BQ123) (55). Estes resultados podem ter importantes implicações no tratamento e prevenção da ND, assim como de outras complicações do DM.

ESTUDOS GENÉTICOS

O papel das endotelinas na regulação da hemodinâmica renal assim como no crescimento da matriz extracelular, faz com que os genes envolvidos neste sistema sejam candidatos naturais implicados no desenvolvimento da nefropatia em pacientes com DM. Como citado anteriormente, a hiperglicemia *per se* leva a um aumento na expressão do gene da ET-1 (56). Entretanto, não existem estudos que avaliem se alterações funcionais nesses genes poderiam estar associadas à presença de ND. O gene do receptor ET-A apresenta 5 polimorfismos silenciosos conhecidos e 11 polimorfismos em regiões não codificadoras (introns). Alguns destes polimorfismos (ET-A/EX8nt211, ET-A/EX8nt1363) estão associados à maior pressão de pulso (57). Entretanto, nenhum deles foi testado em relação à presença de ND.

CONCLUSÕES

Evidências atuais indicam que a ET-1 é um importante mediador da disfunção endotelial que leva a hipertrofia vascular, aterogênese e glomeruloesclerose. Seu nível sérico aumentado nos pacientes com DM sugere uma importante associação com a ND. Reforçado por estudos de intervenção, pode se inferir que esta associação tenha um efeito causal na etiologia da ND e que não seja meramente secundária à presença da mesma (epifenômeno). A aplicação clínica de bloqueadores do efeito das endotelinas é promissor e, caso se confirme, poderá ser uma importante opção terapêutica no tratamento e prevenção desta complicação do DM. Por fim, estudos que avaliem se existe variante gênica associada à ND permitiriam uma identificação precoce de grupos de indivíduos suscetíveis, onde uma intervenção mais precoce e agressiva seria benéfica.

REFERÊNCIAS

- 1) Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis a 3.6-year follow-up study. **J Diabetes Complications** 2000;14:266-71.
- 2) United States Renal Data System (USRDS) 1999. Annual data report: Patient characteristics at the start of ESRD: data from the HCFA medical evidence form. **Am J Kidney Dis** 1999;34:S63-S73.
- 3) Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, Costa LA, Canani LH, dos Santos KG, Crispim D, Roisenberg I, Lisboa HR, Tres GS, Tschiedel B, Gross JL. Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus **Rev Assoc Med Bras** 2004;50:263-67.
- 4) Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS 64) **Kidney Int** 2003;63:225-32.
- 5) Nelson RJ, Pettit DJ, Carraher MJ, Baird HR, Knowler WC. Effect of proteinuria on mortality in NIDDM. **Diabetes** 1998;37:1499-04.
- 6) Mauer SM, Steffes MW, Brown DM. The kidney in diabetes. **Am J Med** 1981;70: 603-12.
- 7) Kimmestiel P, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of kidney. **Am J Pathol** 1936;12:83-97.
- 8) Fioretto P, Mauer M, Brocco E, Velussi M, Frigato F, Muollo B, et al. Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. **Diabetologia** 1996;39:1569-76.
- 9) Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. Structural- functional relationships in diabetic nephropathy. **J Clin Invest** 1984;74:1143-55.
- 10) UK Prospective Diabetes Study. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UKPDS 38. **Br Med J** 1998;317:703-13.
- 11) Hollemberg NK. Treatment of the patient with diabetes mellitus and risk of nephropathy. **Arch Intern Med** 2004;164:125-30.

- 12) Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. **Diabetes Care** 2005;28(1):164-176.
- 13) Krolewski AS. Genetics of diabetic nephropathy. Evidence for major and minor gene effects. **Kidney Int** 1999;55:1582-96.
- 14) Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. **Diabetes** 1999;48:909-13.
- 15) Khoury MJ, Beaty TH, Liang K-Y. Can familial aggregation of disease be explained by environmental risk factors? **Am J Epidemiology** 1988;127:674-83.
- 16) Gross ML, Amann K. Progression of renal disease new insights into risk factors and pathomechanisms. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 2004;133:307-12.
- 17) Lasaridis AN, Sarafidis PA. Diabetic nephropathy and antihypertensive treatment. What are the lessons from clinical trials? **Am J Hypertens** 2003;16:689-97.
- 18) Mogensen CE, Keane WF, Bennett PH, Jerums G, Parving HH, Passa P, et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. **Lancet** 1995;346:1080-84.
- 19) Penno G, Chaturvedi N, Taimund PJ, Cotroneo P, Manto A, Nannipieri M, et al. EUCLID Study Group. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients. **Diabetes** 1998;47:1507-11.
- 20) Hopfner RL, Gopalakrishnan V, Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. **Diabetologia** 1999;42:1383-94.
- 21) Levin ER, Endothelins. **N Engl J Med** 1995;333:356-63.
- 22) Abdel-Sayed S, Nussberger J, Aubert JF, Gohlke P, Brunner HR, Brakch N. Measurement of plasma endothelin-1 in experimental hypertension and in healthy subjects. **Am J Hypertens** 2003;16:515-21.
- 23) Schneider JC, Tilly N, Hierl T, Sommer U, Hamann A, Dugi K, et al. Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. **Am J Hypertens** 2002;15:967-72.

- 24) Seligman BGS, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N. Increased plasma level of endothelin-1 and Von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. **Diabetes Care** 2000;23:1395-400.
- 25) Mattia GD, Faldetta MC, Bellini C, Bravi MC, Laurenti O, Baldoncini R, et al. Role of plasma and urinary endothelin-1 in early diabetic and hypertensive nephropathy. **Am J Hypertens** 1998;11:983-88.
- 26) Ferri C, Bellini C, Desideri G, Di Francesco L, Baldoncini R, Santucci A, De Mattia G. Plasma Endothelin-1 levels in obese hypertensive and normotensive. **Diabetes** 1995;44:431-36.
- 27) Ferri C, Bellini C, Desideri G, Baldoncini R, Properzi G, Santucci A, De Mattia G. Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 1997;105:38-40.
- 28) Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Psychari SN, Kolettis T, Sbarouni E, Webb DJ. Coronary vasoconstriction after coronary angioplasty is attenuated by endothelin receptor antagonism. **Am J Cardiol** 2001;87:1011-13.
- 29) Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Matsumoto H, Suzuki N, Kimura C, et al: Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in a renal adenocarcinoma cell line: molecular cloning of cDNA encoding the precursor of ET-2 and its characterization. **FEBS Lett** 1990;274:136-40.
- 30) Dupin, E, Glavieux C, Vaigot P, Le Douarin N M. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. **Proc Nat Acad Sci** 2000;97:7882-87.
- 31) Simonson MS. Endothelins: multifuncional renal peptides. **Physiol Rev** 1993;73:375-11.
- 32) Hes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. **Lancet** 1994;344:852-54.
- 33) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature** 1990;348:730-32.

- 34) Tabuchi Y, Nakamaru M, Rakugi H, Nagano M, Mikami H, Ogihara T. Endothelin inhibits presynaptic adrenergic neurotransmission in rat mesenteric artery. **Biochem Biophys Res Comm** **1989**;161:803-08.
- 35) Vane JR, Angaard EA, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Eng J Med** **1990**;323:27-36.
- 36) Barton M, Luscher TF. Endothelin antagonists for hypertension and renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens** **1999**;8:549-56.
- 37) Kohmo M, Yasunari K, Murakawa KL, Yokokawa K, Horio T, Takeda T, et al. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. **Am J Med** **1990**;88:614-18.
- 38) Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. **Circulation** **2002**;105:452-56.
- 39) Sugimoto K, Tsuruoka S, Fujimura A. Renal protective effect of YM598, a selective endothelin ET-A receptor antagonist, against diabetic nephropathy in OLETF rats. **Eur J Pharm** **2002**;450:183-89.
- 40) Cosenzi A, Bernobich E, Trevisan R, Milutinovic N, Borri A, Bellini G. Nephroprotective effect of bosentan in diabetic rats. **J Cardiovasc Pharmacol** **2003**;42:752-56.
- 41) Ding SS, Qiu C, Hess P, Xi J-F, Zheng N, Clozel M. Chronic endothelin receptor blockade prevents both early hyperfiltration and late overt diabetic nephropathy in the rat. **J Cardiovasc Pharmacol** **2003**;42:48-54.
- 42) Sorokin A, Kohan DE. Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. **Am J Physiol renal Physiol** **2003**;285:F579-89.
- 43) Herizi A, Jover B, Bouriquet N, Mimran A. Prevention of the cardiovascular and renal effects of angiotensin II by endothelin blockade. **Hypertension** **1998**;31:10-14.

- 44) Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Osada S, Tomino Y, Goto K, et al. Gene expression for endothelins and their receptor in glomeruli of diabetic rats. **J Lab Clin Med** **1993**;122:149-56.
- 45) Ferrario RG, Foulkes R, Salvati P, Patrono C. Hemodynamic and tubular effect of endothelin and thromboxane in the isolate perfused rat kidney. **Eur J Pharmacol** **1989**;171:127-34.
- 46) Sadoshima J-I, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. **Cell** **1993**;75:977-84.
- 47) Ito H, Hirata Y, Adachi S. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. **J Clin Invest** **1993**;92:398-03.
- 48) Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: results of the Survival and Ventricular Enlargement Trial. **N Engl J Med** **1992**;327:669-77.
- 49) Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF. Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. **Circulation** **1997**;96:1593-97.
- 50) Vermes I, Sporen IFM, Kalsbeek-Batenburg EM. In addition to von Willebrand factor and urinary albumin excretion, plasma endothelin is an indicator of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Diabetologia** **1993**;36:472-73.
- 51) Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increase activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. **Circulation** **2002**;106:1783-87.
- 52) Hargrove GM, Dufresne J, Whiteside C, Muruve DA, Wong NC. Diabetes mellitus increase endothelin-1 gene transcription in rats Kidney. **Kidney Int** **2000**;58:1534-45.
- 53) Stehouwer CDA, Fischer HRA, Van Kujik AWR. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. **Diabetes** **1995**;44:561-64.
- 54) Hocher B, Schwartz A, Reinbacher D, Jacobi J, Lun A, Priem F. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. **Nephron** **2001**;87:161-69.

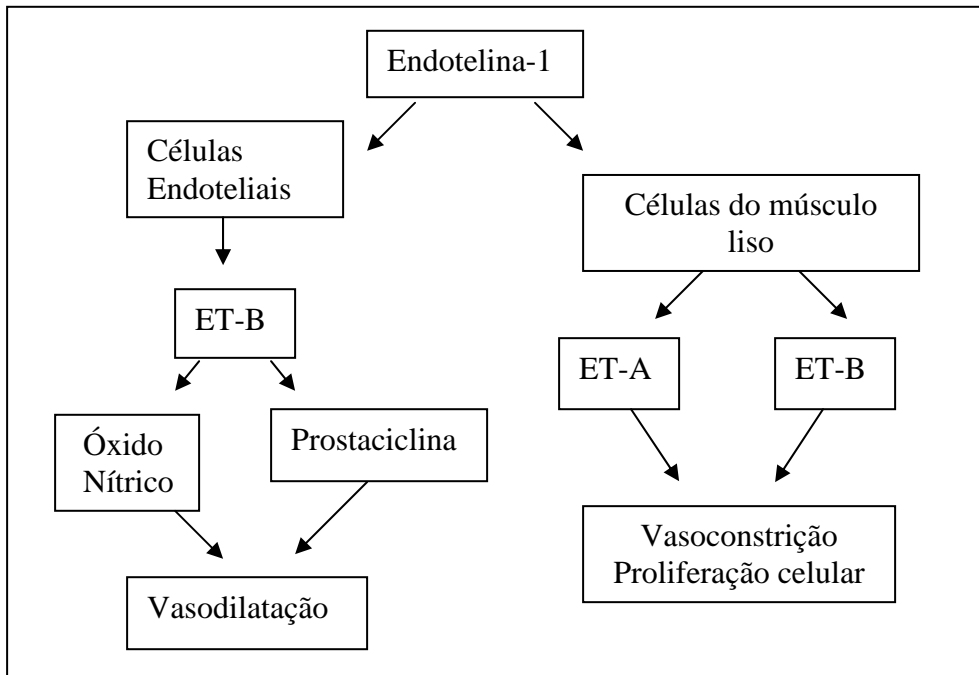
- 55) Marther KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. ET-1A Receptor blockade improves endothelium-dependent vasodilation in insulin resistant obese and type 2 diabetic patients – endothelin-1A. **Diabetes** 2000;51:3517-23.
- 56) Park J-Y, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, et al. Induction of endothelin-1 expression by glucose. **Diabetes** 2000;49:1239-48.
- 57) Nicaud V, Poirier O, Behague I, Herrmann S-M, Mallet C, Troesch A, et al. The Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. Polymorphisms of the endothelin-A and -B receptor genes in relation to blood pressure and myocardial infarction. **Am J Hypertens** 1999;12:304-10.

Tabela 1: Valores de albuminúria e de proteinúria utilizados no diagnóstico de nefropatia diabética*

Categoria	urina de 24 horas	amostra de urina casual
Normal		
Normoalbuminúria	< 20 mg/min	< 17 mg/L
Nefropatia incipiente		
Microalbuminúria	20 – 200 mg/min	17 – 174 mg/L
Nefropatia clínica		
Macroalbuminúria	> 200 mg/min	> 174 mg/L
Proteinúria	≥ 500 mg/24h	≥ 430 mg/L

* Gross JL. Rotinas diagnóstica em endocrinologia 2004, Pág. 25-28

Figura 1: Ação da endotelina através dos receptores ET-B nas células endoteliais causando vasodilatação e através dos receptores ET-A e ET-B nas células do músculo liso vascular causando vasoconstrição



Quadro 1: Fatores relacionados à expressão e síntese da ET-1

Estimulam	Inibem
Angiotensina II Catecolaminas Fator de crescimento Hipóxia Insulina Lipídios (LDL, HDL) <i>Shear stress</i> Hiperglicemia	Óxido Nítrico Prostaglandinas Prostaciclina Hormônio atrial natriurético Endotelina-3 Estrogênios

OBJETIVOS

- 1)** Avaliar a relação dos níveis de ET-1 plasmática com a excreção urinária de albumina em pacientes com DM tipo 2.
- 2)** Avaliar se as características clínicas e laboratoriais interferem nos níveis de ET-1 nestes pacientes.

**ENDOTHELIN-1 LEVELS ARE INCREASED IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS
AND DIABETIC NEPHROPATHY**

Running title: Plasma endothelin-1 and diabetic nephropathy

Claudete M Zanatta¹, MD

Fernando Gerchman¹, MD

Lucas Burttet¹

Maria Caroline Jacques-Silva¹

Jorge Luiz Gross¹, MD

Luís H Canani¹, MD

¹Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Luis H Canani

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

Rua Ramiro Barcelos 2350 – Prédio 12 – 4º andar

90035-003 – Porto Alegre, RS – Brazil

Phone/fax: + 55 51 21018777/33325188

e-mail: luiscanani@terra.com.br

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the relationship of plasma endothelin-1 (ET-1) levels and the urinary albumin excretion rate (UAER) in patients with type 2 diabetes mellitus (DM).

RESEARCH DESIGN AND METHODS: A cross-sectional study was conducted in 144 patients with type 2 DM (WHO criteria, 61 males, mean age: 58 ± 11.7 years, mean DM duration: 13.8 ± 8.2 years). UAER (immunoturbidimetry), ET-1 (ELISA), and insulin (electrochemiluminescence), were measured. Insulin resistance was estimated by HOMA index (HOMA-ir).

RESULTS: Plasma ET-1 level had a positive correlation with 24-h UAER ($r = 0.415$, $P < 0.001$), fasting plasma glucose ($r = 0.311$, $P < 0.001$), A1c ($r = 0.341$, $P < 0.001$), triglycerides ($r = 0.310$, $P = 0.001$), waist circumference ($r = 0.259$, $P < 0.001$), BMI ($r = 0.168$, $P = 0.02$), systolic blood pressure ($r = 0.294$, $P < 0.001$) and HOMA-ir ($r = 0.350$, $P < 0.001$). In a linear multivariate regression analysis, ET-1 remained associated with UAER after controlling for age, gender, BMI, systolic blood pressure, A1c and total cholesterol ($R = 0.521$; adjusted $R^2 = 0.208$, $P < 0.001$). Furthermore, there was a progressive increase in plasma ET-1 levels from patients with normoalbuminuria ($n = 89$, 1.18 ± 0.44 pg/ml) to microalbuminuria ($n = 35$, 1.47 ± 0.49 pg/ml) and macroalbuminuria ($n = 20$, 2.12 ± 1.12 pg/ml, $P < 0.001$).

CONCLUSIONS: There is an independent association of ET-1 plasma levels with UAER and progressive stages of DN and this might indicate the presence of progressive endothelial dysfunction as DN progresses to more advanced stages.

Key words: diabetic nephropathy, diabetes mellitus, endothelin, endothelial dysfunction, microalbuminuria

INTRODUCTION

Approximately 30-40% of all patients with type 2 diabetes mellitus (DM) develop diabetic nephropathy (DN) (1, 2) that is associated with excess mortality mainly due cardiovascular disease (3, 4). Arterial hypertension and hyperglycemia are the main known risk factors for DN (5), and they are components of metabolic syndrome. Clustering of metabolic syndrome components is associated with micro- and macrovascular complications of DM (6, 7) and metabolic syndrome has been associated with endothelial dysfunction (8). In type 2 DM, endothelial dysfunction, increased urinary albumin excretion rate (UAER), and chronic inflammation are interrelated processes that develop in parallel, and are strongly and independently associated with risk of death (9). In fact, we have previously reported that normoalbuminuric dyslipidemic type 2 diabetic patients had increased levels of endothelin-1 (ET-1) and this was associated with UAER and insulin resistance (10). ET-1 is the predominant isoform of the endothelin family (11) and it is a potent vasoconstrictor peptide produced by endothelial and vascular smooth muscle cells. ET-1 is found in a variety of tissues and is thought to modulate vascular tone, cell proliferation and hormone production (12). Endothelial dysfunction increases ET-1 production leading to vascular hypertrophy, atherogenesis and, in the kidney, glomerulosclerosis. An elevated plasma ET-1 level has been reported in patients with DM (10, 13, 14), but the relationship between ET-1 and albuminuria is conflicting (14-16). The use of ET receptor antagonists has renoprotective properties, correcting the early hemodynamic abnormalities in experimental DM (17-19), reinforcing the importance of this system in the pathogenesis of DN.

The aim of the present study was to evaluate the relationship between plasma ET-1 levels and the UAER in patients with type 2 DM.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

A cross-sectional study was conducted in 144 patients with type 2 DM (World Health Organization criteria) (20) participating in a multicenter research protocol in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Patients were not eligible to participate in the study in the presence of any of the following criteria: renal impairment (serum creatinine ≥ 1.5 mg/dl); any cardiovascular event during the 6 months preceding the enrollment (stroke, myocardial infarction, unstable angina, lower limb amputation, bypass surgery, or percutaneous revascularization); heart failure (New York Heart Association class II or greater); liver disease (history or elevated liver enzymes), any malignancy, or any acute inflammatory or infectious process. The Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved this study. Informed consent was obtained from all patients willing to participate.

The patients' renal status was classified based on UAER measured in 24-h timed urine in at least two out of three sterile urine samples 6 months apart into normoalbuminuria (UAER < 20 $\mu\text{g}/\text{min}$), microalbuminuria (UAER: 20-199 $\mu\text{g}/\text{min}$) or macroalbuminuria (UAER > 200 $\mu\text{g}/\text{min}$). UAER measurements were performed after interruption of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor therapy for at least two weeks.

Evaluation of subjects

All subjects underwent standardized clinical and laboratory evaluation as previously described (21). Briefly, patients answered a standard questionnaire that includes questions about age, age at diabetes diagnosis, smoking habits, ethnicity, and drug treatment. They underwent a physical examination and laboratory tests. Patients were weighed in light outdoor clothes without shoes, and height was recorded. BMI was calculated as weight (in kilograms) divided by height (in meters) squared. Waist circumference was measured with a soft tape on standing subjects midway between the lowest rib and the iliac crest. Sitting blood pressure was measured twice after a 10-min rest to the nearest 2 mmHg. Hypertension was defined as blood

pressure levels $\geq 140/90$ mmHg or the use of antihypertensive medication. Retinopathy was assessed by an ophthalmologist by using direct and indirect ophthalmoscopy through dilated pupils and classified as absent, nonproliferative, or proliferative.

Laboratory evaluation

Laboratory evaluation was performed in the morning, after a 12-h fasting and a 30-min resting period. Patients were instructed to avoid intense exercise and not to start new medications that could interfere with endothelial function in the previous 24-h. To measure plasma ET-1, venous blood (10 ml) was drawn and put into a refrigerated tube containing EDTA. Samples were centrifuged at 8°C and were stored at -70°C for subsequent blind analyses performed simultaneously for all the samples. Extraction of ET-1 was performed using a centrifugal evaporator after plasma-solvent dilution [acetone: 1 N HCl: water (40: 1: 5)]. ET-1 assay was carried out immediately after extraction [ELISA - R&D System, Minneapolis, MN; sensitivity <1.0 pg/ml, mean intra- and interassay coefficient of variation (CV): 4.2 and 5.1%, respectively]. The reference range in healthy nondiabetic subjects (age: 40 to 65 years) at our laboratory is 0.69 ± 0.25 pg/ml (10). Plasma insulin levels was measured by electrochemiluminescence (Elecsys R Systems/2010 – ROCHE, sensitivity 0.2 $\mu\text{UI/mL}$, mean intra- and interassay CV: 2.0 and 5.96%, reference range $2.6 - 24.9$ $\mu\text{UI/mL}$). High sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was measured by immunonephelometry (Dade Behring, Newark, DE, sensitivity 0.175 mg/l, mean intra- and interassay CV: 4.4 and 5.7%, respectively, reference range $0.1 - 10$ mg/L). Albuminuria was measured by immunoturbidimetry (SERA-PAK® immuno Microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, NY, mean intra- and interassay CV: 4.5% and 7.6%, respectively). Glucose was measured by the glucose oxidase method, A1c by ion exchange high-performance liquid chromatography (Merck-Hitachi L-9100 A1c analyzer, Merck, Darmstadt, Germany; reference range: $4.7 - 6.0$ %) and serum creatinine by Jaffé's reaction. The homeostasis model assessment (HOMA-ir) was used to estimate insulin resistance in patients not using insulin ($\text{HOMA-ir} = \text{fasting insulin (mUI/ml)} \times$

fasting plasma glucose (mmol/l)/22.5) (22). Glomerular filtration rate (GFR) was estimated using the Modification of Diet in Renal Disease Study Group (MDRD) equation {GFR (ml min⁻¹ 1.73 m⁻²) = 186 × [serum creatinine (mg/dl)^{-1.154} × age (years)^{-0.203} × (0.742 if female) × (1.210 if African American)]} (23).

Statistical analysis

Clinical and laboratory characteristics of subjects were compared by chi-square or ANOVA test. Tukey's test was used for post-hoc multiple comparisons. Linear multiple regression analysis was used to determine the independent factors associated with UAER. Continuous data were expressed as mean ± SD or as medians and minimum-maximum values. Triglycerides, UAER and HOMA-ir, not normally distributed, were logarithmically transformed before analysis. Data with normal and non-normal distribution were analyzed using Pearson's correlation tests. P values <0.05 were considered significant. SPSS version 10.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for the analyses.

RESULTS

A total of 144 patients with type 2 DM (61 males, mean age: 58 ± 11.7 years, mean DM duration: 13.8 ± 8.2 years) were evaluated. DN was present in 55 (38.2%) patients (35 micro- and 20 macroalbuminurics). There was an increase in the prevalence of males according the degree of DN (table 1). Patients with macroalbuminuria had longer DM duration than patients with normo- or microalbuminuria (17.5 ± 11 vs. 11.1 ± 8.2 and 11.1 ± 6.5 years, P = 0.007). Mean age, ethnic distribution and the proportion of patients using metformin (normo- 71.9%, micro- 77.1% and macroalbuminuria 75.0%, P = 0.809) was similar among the different renal status groups. There were also no differences in BMI, abdominal circumference, systolic and diastolic blood pressures and smoking habit among groups. As expected, patients with micro- and macroalbuminuria were using ACE inhibitors more often than patients with normoalbuminuria (P = 0.031).

Regarding the laboratory data, triglyceride levels were significantly lower in normoalbuminuric patients than micro- and macroalbuminurics. Fasting plasma glucose, A1c, total cholesterol, HDL cholesterol, HOMA-ir and hs-CRP levels were similar across the renal status groups. Patients with microalbuminuria had higher serum creatinine than patients with normoalbuminuria, but the GFR was similar among the groups (81.3 ± 22.3 , 79.0 ± 25.9 and 69.7 ± 15.3 ml min⁻¹ 1.73 m⁻², P = 0.139).

The plasma ET-1 level had a positive correlation with 24-h UAER (r = 0.415, P <0.001), fasting plasma glucose (r = 0.311, P <0.001), A1c (r = 0.341, P <0.001), triglycerides (r = 0.310, P = 0.001), waist circumference (r = 0.259, P <0.001), BMI (r = 0.168, P = 0.02), systolic blood pressure (r = 0.294, P <0.001) and HOMA-ir (r = 0.350, P <0.001). Analyzing only those patients using metformin (n = 91), the correlation between UAER and plasma ET-1 was r = 0.476 (P <0.001). The same was observed among patients that had ACE inhibitors suspended (r = 0.374, P = 0.003) and those that were not using these drugs (r = 0.392, P = 0.001). No correlation was observed between plasma ET-1 levels and hs-RCP (P = 0.106), serum creatinine (r = 0.07, P = 0.374) or GFR (r = - 0.06, P = 0.456).

In a linear multivariate regression analysis, ET-1 remained associated with UAER after controlling for age, gender, BMI, systolic blood pressure, A1c and total cholesterol (R = 0.521; adjusted R² = 0.208, P <0.001). Other multivariate models that included waist circumference instead of BMI, fasting plasma glucose instead of A1c, diastolic blood pressure instead of systolic blood pressure, triglycerides instead of total cholesterol showed similar results (data not shown).

Figure 1 shows the progressive increase in plasma ET-1 levels from patients with normoalbuminuria to micro- and macroalbuminuria (1.18 ± 0.44 vs. 1.47 ± 0.49 vs. 2.12 ± 1.12 pg/ml, P <0.001). In patients on metformin, the same pattern of plasma ET-1 levels was observed

(normoalbuminuria 1.15 ± 0.43 , microalbuminuria 1.49 ± 0.50 and macroalbuminuria 1.91 ± 0.62 pg/ml, $P < 0.001$).

CONCLUSION

In this sample of patients with type 2 DM there was a significant correlation of plasma levels of ET-1 and UAER, even after controlling for age, gender, BMI, systolic blood pressure, A1c and total cholesterol. Furthermore, there was a progressive increase in ET-1 levels according to the stage of DN, the highest level being seen among patients with macroalbuminuria.

Very few studies analyzed the association of plasma ET-1 levels and UAER and stages of DN. A positive correlation has been described between ET-1 levels and UAER in normotensive patients with type 2 DM and microalbuminuria (15). Moreover, patients with type 2 DM and microalbuminuria have higher values of plasma ET-1 than normoalbuminuric patients (14). In another study, the association was observed only among patients with macroalbuminuria (16). All these studies included a small number of selected patients with DM, thus making it difficult to generalize these findings. Diabetes *per se* is associated with increased plasma ET-1 levels (10, 13) and hyperglycemia is the most likely metabolic factor inducing the increase in ET-1 levels, although insulin resistance may also have an effect (24).

Metformin could decrease plasma ET-1 levels (25) due to increased insulin sensitivity. The proportion of patients using metformin was similar in all groups and the same pattern of results was seen among only those on metformin. ACE inhibitors can also decrease ET-1 levels. ACE inhibitors were suspended for two weeks before the blood was drawn for ET-1 measurements. This off-drug period may have been too short, and some residual effect might still influence ET-1 levels. In this case, this effect would reduce the differences found, since the proportion of patients on this drug class was higher among micro- and macroalbuminuric patients

than normoalbuminurics. Moreover, the correlations between UAER and plasma ET-1 were the same among those that had the drug suspended and those that were not using it.

The association of ET-1 and UAER was still significant after controlling for fasting plasma glucose, A1c and HOMA-ir. Other factors involved in ET-1 levels, such as age, gender, BMI and lipid profile, did not differ according to the patient's renal status, and therefore does not explain our results. Therefore this association seems to be real, but due to the cross-sectional design of the study, the causality effect of the association cannot be clearly determinate. The increased levels of ET-1 might be leading to renal disease or could be a marker of generalized vascular dysfunction that includes glomerular endothelial lesion. However, the use of an ET receptor antagonist (ET receptors A and B antagonist – bosentan) has been reported as renoprotective, correcting the hyperfiltration and the development of microalbuminuria in experimental DM (17-19). Furthermore, a 9-year prospective study showed that the endothelial dysfunction and microalbuminuria are interrelated processes that progress in parallel (9). These observations suggest that elevation of ET-1 might have a deleterious effect on the kidney, and it is not only a marker of an already established lesion.

The mechanism by which ET-1 might cause glomerular damage is not clearly understood. Mesangial cells play a central role in the physiology and pathophysiology of ET-1 in the kidney. Mesangial cells release ET-1 in response to a variety of factors and also express ET receptors. Activation of this system leads to hypertrophy and proliferation of mesangial cells, vasoconstriction and extracellular matrix accumulation (26). Another possible mechanism is through the interaction with the renin-angiotensin system. Several studies highlight interactions between these two systems (27, 28). The matrix protein synthesis induced by ET-1 can be prevented by ACE inhibition in cultured mesangial cells. In the same way the effect of angiotensin II can be prevented by ET-1 antagonism (29). These observations suggest that ET-1 and angiotensin II signal through common intracellular pathways.

In conclusion, the association of ET-1 plasma levels with UAER and micro- and macroalbuminuria might indicate the presence of progressive endothelial dysfunction as DN progresses to more advanced stages, and may be one of the reasons for the association of DN with cardiovascular disease.

Acknowledgments: This study was partially supported by grants from Projeto de Núcleos de Excelência do Ministério de Ciência e Tecnologia and Hospital de Clínicas de Porto Alegre. LHC is the recipient of a postdoctoral (ProDoc) grant from Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Fundação CAPES).

REFERENCES

- 1) Bruno RM, Gross JL: Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications* 14:266-271, 2000
- 2) Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS 64) *Kidney Int* 63:225-32, 2003
- 3) Nelson RJ, Pettit DJ, Carraher MJ, Baird HR, Knowler WC: Effect of proteinuria on mortality in NIDDM. *Diabetes* 37:1499-1504, 1998
- 4) Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T: Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* 28:164-176, 2005
- 5) UK Prospective Diabetes Study: Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UKPDS 38. *Br Med J* 317:703-713, 1998
- 6) Costa LA, Canani LH, Lisboa HR, Tres GS, Gross JL: Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 21:252-255, 2004

- 7) Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683-689, 2001
- 8) Piatti PM, Monti LD, Galli L, Fragasso G, Valsecchi G, Conti M, Gernone F, Pontiroli AE: Relationship between endothelin-1 concentration and metabolic alterations typical of the insulin resistance syndrome. *Metabolism* 49:748-52, 2000
- 9) Stehouwer CDA, Gall M-A, Twisk JWR, Knudsen E, Emeis JJ, Parving H-H: Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 51:1157-1165, 2002
- 10) Seligman BGS, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N: Increased plasma level of endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 23:1395-1400, 2000
- 11) Hopfner RL, Gopalakrishnan V: Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 42:1383-1394, 1999
- 12) Levin ER: Endothelins. *N Engl J Med* 333:356-363, 1995
- 13) Schneider JG, Tilly N, Hierl T, Sommer U, Hamann A, Dugi K, Leidig-Bruckner G, Kasperk C: Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus: *Am J Hypertens* 15:967-972, 2002
- 14) Mattia GD, Faldetta MC, Bellini C, Bravi MC, Laurenti O, Baldoncini R, et al: Role of plasma and urinary endothelin-1 in early diabetic and hypertensive nephropathy. *Am J Hypertens* 11:983-88, 1998
- 15) Bruno CM, Meli S, Marcinno M, Ierna D, Sciacca C, Neri S: Plasma endothelin-1 levels and albumin excretion rate in normotensive, microalbuminuric type 2 diabetic patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 16:114-17, 2002

- 16) Vermes I, Sporen IFM, Kalsbeek-Batenburg EM, Haanen C: In addition to von Willebrand factor and urinary albumin excretion, plasma endothelin is an indicator of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:472-473,1993
- 17) Cosenzi A, Bernobich E, Trevisan R, Milutinovic N, Borri A, Bellini G: Nephroprotective effect of bosentan in diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:752-56, 2003
- 18) Ding SS, Qiu C, Hess P, Xi J-F, Zheng N, Clozel M: Chronic endothelin receptor blockade prevents both early hyperfiltration and late overt diabetic nephropathy in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 42:48-54, 2003
- 19) Hocher B, Schwartz A, Reinbacher D, Jacobi J, Lun A, Priem F: Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy. *Nephron* 87:161-169, 2001
- 20) World Health Organization, definition, diagnosis and classification of diabetes and its complications 1999
- 21) Canani LH, Gerchman F, Gross JL: Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48:909-913, 1999
- 22) Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M: Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23:57-63, 2000
- 23) Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G: National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med.* 139:137-47, 2003
- 24) Park J-Y, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha S-W, Méier M, Rhodes CJ, King GL: Induction of endothelin-1 expression by glucose. *Diabetes* 49:1239-48, 2000

- 25) Diamantis-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, Migdalis I: Increase endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4666-73, 2001
- 26) Sorokin A, Kohan D E: Physiology and pathology of endothelin-1 in renal mesangium. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F579-F589, 2003
- 27) Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, Largo R, Lopez-Armada MJ, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J: Effects and interaction of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertens* 27:885-92,1996
- 28) Larivière R, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Boucher D: Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens* 11:989-97, 1998
- 29) Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA: Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation* 105:452-56, 2002

Table 1: Clinical and laboratory characteristics of subjects according to renal status

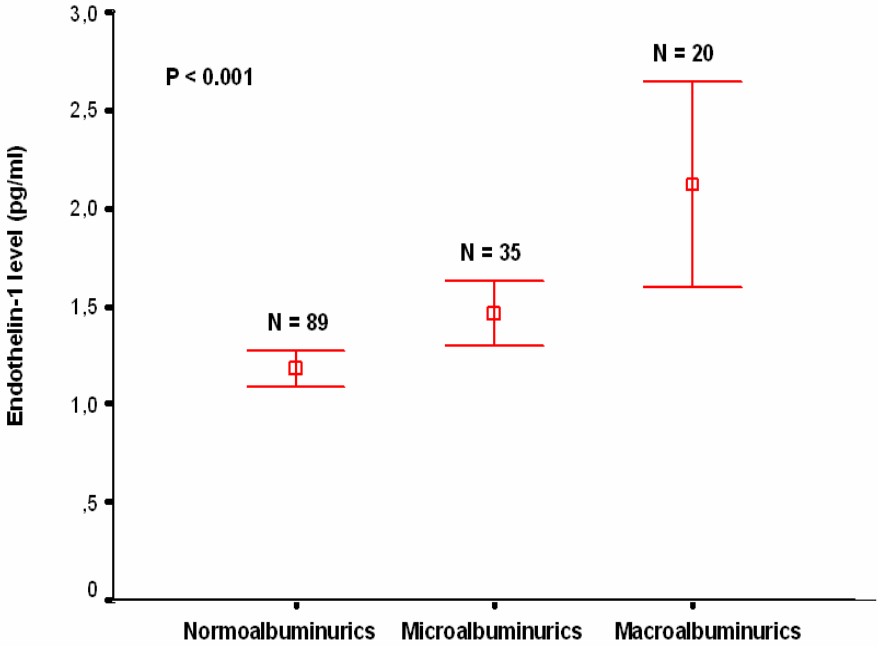
	Renal Status			P
	Normo n = 89	Micro n = 35	Macro n = 20	
Male Sex – n (%)	30 (33.7)	18 (51.4)	13 (65.0)	0.017
Age (years)	57.9 ± 12.1	57.2 ± 11.0	60.9 ± 11.4	0.497
Duration of diabetes (years)	11.1 ± 8.2	11.1 ± 6.5	17.5 ± 11	0.007*
Whites – n (%)	58 (65.2)	23 (65.7)	16 (80)	0.429
Meformin use – n (%)	64 (71.9)	27 (77.1)	15 (75.0)	0.809
ACE inhibitors use – n (%)	35 (39.3)	22 (62.9)	12 (60.0)	0.031
Body mass index (kg/m²)	29.1 ± 4.3	30.4 ± 6.1	29.0 ± 3.6	0.367
Waist (cm)	99.6 ± 10.3	103.9 ± 12.5	102.4 ± 10.5	0.140
Systolic BP (mmHg)	137 ± 20	145 ± 21	133 ± 17	0.071
Diastolic BP (mmHg)	80 ± 10	84 ± 12	78 ± 15	0.105
Hypertension – n (%)	33 (62.9)	28 (80)	16 (80)	0.097
Smoking –n (%)	19 (12.5)	06 (11.1)	05 (11.8)	0.773
A1c (%)	8.0 ± 2.0	8.8 ± 2.6	8.0 ± 1.6	0.132
Fasting plasma glucose (mg/dL)	164 ± 54	186 ± 82	164 ± 82	0.220
Total cholesterol (mg/dL)	194 ± 42	198 ± 50	185 ± 32	0.561
HDL cholesterol (mg/dL)	48 ± 12	47 ± 12	43 ± 13	0.251
Triglycerides (mg/dL)	125 (34-573)	192 (55-335)	172 (79-662)	0.041 [†]
HOMA-ir	3.15 (0.49-13.96)	8.55 (1.22-51.22)	5.00 (1.02-8.91)	0.055
hs C-Reactive Protein	5.05 (0.35-09.0)	7.50 (0.36-11.2)	8.26 (0.38-09.8)	0.844
Serum creatinine (mg/dL)	0.90 ± 0.21	0.98 ± 0.25	1.2 ± 0.31	0.002 [‡]
GFR (ml min⁻¹ 1.73 m⁻²)	81.3 ± 22.3	79.0 ± 25.9	69.7 ± 15.3	0.139

Data are means ± SD, median (range) or number (%)

* normo- and micro- vs. macroalbuminuric; [†] normo- vs. micro- and macroalbuminuric; [‡] normo vs. macroalbuminuric.

HOMA-ir = homeostasis model assessment; GFR = Glomerular filtration rate.

Figure 1: Plasma ET-1 level among the different renal status groups



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Endotelinas são peptídeos produzidos pelas células endoteliais, com potente ação vasoconstritora e parecem estar envolvidas na ND.

Estados patológicos relacionados com disfunção endotelial como, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia, presentes no DM, causam aumento na produção de endotelina-1, comprovado em vários estudos. A ND está relacionada com um estado de maior disfunção endotelial, avaliado pela alta mortalidade por doenças cardiovasculares.

A ação da ET-1 no rim causa alterações estruturais renais semelhantes as que ocorrem na ND. As células mesangiais nos glomérulos produzem ET-1 e também apresentam receptores para ET-1, com isso, além de produzirem ET-1, sofrem alterações relacionadas ao aumento da ET-1.

Uso de inibidores do sistema renina-angiotensina e inibidores do receptor da angiotensina retardam a progressão para ND. Apesar de retardar sua evolução, a ND ainda é uma complicação freqüente e grave dos pacientes com DM. O entendimento dos fatores envolvidos na sua instalação e progressão pode ajudar no manejo e/ou prevenção desta complicação.

Vários estudos demonstram que os pacientes com ND apresentam maior disfunção endotelial, caracterizada pela maior mortalidade por doenças cardiovasculares, conforme progride a doença renal. Neste estudo ficou demonstrada associação dos níveis da ET-1 nos diferentes estágios da ND. Estudos funcionais, com uso de bloqueadores do receptor A da endotelina junto com substâncias

vasodilatadoras mostram melhora na vasodilatação endotélio dependente em pacientes com DM tipo 2, avaliado através da técnica de *forearm plethysmography*. Porém novos estudos são necessários para avaliar o efeito vasodilatador nos diferentes estágios da ND e com isso ajudar no entendimento desta doença.

Além disto, estudos genéticos dos genes que codificam a ET-1 e seus receptores (ET-A e ET-B) podem identificar subgrupos com maior risco ou protegidos do desenvolvimento da ND.