

## Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações

### Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications

Amanda Sampaio Storch, João Dario de Mattos, Renata Alves, Iuri dos Santos Galdino, Helena Naly Miguens Rocha  
Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

### Introdução

O endotélio é a monocamada celular que reveste o interior dos vasos sanguíneos, incluindo artérias, veias e as câmaras do coração,<sup>1</sup> atuando como uma camada protetora entre os demais tecidos e o sangue circulante.<sup>2</sup> Essas células são denominadas células endoteliais. O endotélio exerce função determinante no controle da homeostase vascular, participando da regulação de sinais intracelulares,<sup>1</sup> permeabilidade e tônus vascular,<sup>3</sup> cascata de coagulação e angiogênese,<sup>4</sup> entre outros. Uma das principais funções do endotélio é a liberação de substâncias frente a estímulos, que atuam de forma autócrina e/ou parácrina.<sup>2</sup> Dessa forma, agressões ao endotélio geram uma resposta inflamatória, com atuação de diversos tipos celulares (linfócitos, monócitos, plaquetas e células musculares lisas),<sup>5</sup> levando a um quadro de disfunção da célula endotelial, enrijecimento da parede vascular e formação da placa de aterosclerose.<sup>6</sup>

A disfunção endotelial é uma característica precoce chave no desenvolvimento e progressão da placa aterogênica e suas respectivas complicações. Essa condição é caracterizada por uma redução na biodisponibilidade de vasodilatadores derivados do endotélio, tais como o óxido nítrico (NO), e um aumento, relativo ou absoluto, da biodisponibilidade de vasoconstritores. Este desequilíbrio prejudica a vasodilatação dependente do endotélio, marca funcional que caracteriza a disfunção endotelial.<sup>7</sup>

No início da formação da placa ateromatosa, a disfunção endotelial pode ser caracterizada pelo

aumento na expressão e liberação de moléculas de adesão, entre elas, a selectina endotelial (E-selectina), a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1). Essas moléculas são liberadas em resposta a estímulos de citocinas inflamatórias, de lipopolissacarídeos bacterianos ou de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDL-ox). Elas permitem a ligação célula-célula ou célula-matriz extracelular, levando à deposição de células espumosas no espaço subendotelial,<sup>8</sup> e aumento da espessura da parede do vaso, com redução ou até mesmo completa obstrução do lúmen vascular.<sup>9</sup>

A determinação da função da endotelial consiste na análise de sua responsividade a estímulos vasodilatadores ou vasoconstritores, permitindo o avanço no entendimento do desenvolvimento e progressão da aterosclerose e possíveis alvos terapêuticos.<sup>2</sup> Os métodos consistem em análises *in vitro*, como cultura de células endoteliais, e *in vivo*, como a dilatação mediada pelo fluxo (DMF), pletismografia por oclusão venosa (POV) ou dosagem de marcadores séricos. No entanto, nenhuma dessas técnicas atualmente é aplicada para diagnóstico clínico de disfunção endotelial, uma vez que elas são muito invasivas, caras ou difíceis de padronizar.<sup>1</sup>

A alteração da função endotelial precede as alterações ateroscleróticas morfológicas e pode contribuir para o desenvolvimento da lesão e das complicações clínicas finais. As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte natural no mundo, inclusive no Brasil. Dados recentes do DATASUS de 2014 apontaram que aproximadamente 30% dos registros de mortalidade nacional foram decorrentes de doenças cardiovasculares. Dessa forma, a pesquisa clínica, por meio das técnicas mencionadas acima, possibilita o melhor entendimento desse problema e permite que

### Palavras-chave

Endotélio Vascular, Função endotelial, Aterosclerose, Vasodilatação.

#### Correspondência: Amanda Sampaio Storch

Universidade Federal Fluminense - UFF  
Rua Professor Hernani Pires de Melo, 101 São Domingos, Niterói, RJ – Brasil  
E-mail: amandasstorch@gmail.com

novas oportunidades de prevenção e tratamento surjam, diminuindo a morbimortalidade e gastos públicos. O amplo conhecimento das ferramentas de avaliação da função endotelial pelos profissionais da área da saúde possibilita o aprimoramento das mesmas, tornando possível a translação da pesquisa clínica para efetiva aplicação na clínica médica.

A seguir, técnicas de avaliação da função endotelial serão descritas de acordo com últimos achados da literatura.

## Análises *in vitro*

### Cultura de células endoteliais

A cultura de células endoteliais é largamente descrita na literatura, principalmente em estudos que demonstram o efeito do estresse oxidativo e inflamação sobre os mecanismos de mobilização e proliferação dessas células *in vitro*.<sup>1</sup> O desenvolvimento da cultura de células endoteliais a partir de sangue periférico representa um importante passo nas pesquisas sobre células angiogênicas circulantes, uma vez que essas células passaram a ser isoladas para estudo.

Contudo, a utilização da cultura celular para avaliação da função endotelial apresenta prós e contras. A possibilidade do estudo de diferentes vias de sinalização intracelular permite que diversos ensaios sejam feitos, com diferentes objetivos. Por exemplo, a descoberta de marcadores de superfície, anticorpos monoclonais e *beads* magnéticas de imunoensaio facilitaram o processo de isolamento, quantificação e caracterização de células endoteliais. No entanto, essa técnica apresenta limitações em relação a alterações fenotípicas que as células sofrem dependendo do tempo de cultura e do meio utilizado, além de não estar completamente estabelecido como um modelo fiel ao *in vivo*.<sup>10</sup> Dessa forma, o protocolo para realização da cultura deve ser cuidadosamente estudado, uma vez que diferentes fatores de crescimento são conhecidos por estimular diferentes fenótipos nas células em proliferação.<sup>11</sup>

Devido à dificuldade em se estudar o endotélio *in vivo*, diversas técnicas *in vitro* foram desenvolvidas.<sup>12</sup> Dentre essas técnicas, as HUVECs (células endoteliais de veia umbilical humana) têm sido largamente utilizadas como fonte de células endoteliais humanas, uma vez que são livres de patógenos e fisiologicamente mais relevantes que a demais linhagens disponíveis.<sup>13</sup> Culturas primárias com essas células são capazes

de manter características nativas das células do endotélio, incluindo a expressão de marcadores de superfície específicos, além de vias de sinalização de intracelulares.<sup>14</sup>

Uma vez no meio de cultura, essas células apresentam padrão disperso na placa e após dias de incubação, passam a apresentar padrão confluyente, ocupando a maior parte do fundo da placa.<sup>15</sup> Quando a placa se apresenta completamente coberta, as células se agrupam e formam *tight junctions* (junções de oclusão); as células adquirem formato de paralelepípedo e se assemelham ao que ocorre *in vivo*.<sup>16</sup> HUVECs são usualmente utilizadas em pesquisas de biologia molecular, permitindo avanços no estudo da fisiopatologia da formação da placa de ateroma e dos mecanismos responsáveis pelo controle da angiogênese e vascularização das áreas danificadas.<sup>12,17</sup> Culturas de HUVECs possibilitam estudos de interação celular (resultando na análise de moléculas de adesão e citocinas), avaliação dos efeitos da taxa de cisalhamento e fluxo oscilatório na sinalização celular (de forma a reproduzir o fenômeno que ocorre no lúmen dos vasos), além de permitir a descoberta de receptores e fatores de transcrição que participam no desenvolvimento e progressão da disfunção endotelial.<sup>18-20</sup> No entanto, os resultados devem ser interpretados com cuidado devido às já mencionadas limitações da metodologia.

### Ensaio funcionais *in vitro*

Nas últimas décadas, ensaios funcionais *in vitro* vêm sendo utilizados para avaliação da função endotelial, como o banho de órgão e o registro miográfico, e se mostrado técnicas essenciais para a descoberta de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF), sendo o mais estudado entre eles, o óxido nítrico (NO).<sup>21</sup> Tais ensaios são importantes uma vez que nos permitem medir o relaxamento dependente do endotélio de alguns segmentos, em resposta a agonistas reconhecidos – acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio.<sup>22</sup>

O banho de órgão isolado é uma técnica *in vitro* que avalia a reatividade vascular em resposta a agonistas, gerando uma curva dose resposta utilizada para investigar alterações fisiológicas e farmacológicas de preparações biológicas isoladas de várias espécies (coelho, rato, etc). Tecidos e órgãos utilizados incluem: anéis ou tiras de artérias e veias, átrio, ventrículo ou músculo papilar, diafragma, *fundus* de estômago, intestino (duodeno, jejuno e íleo), traqueia, útero, entre outros. Esta técnica tem por função reproduzir um ambiente fisiológico adequado de

temperatura, aeração e nutrientes para análises dessas preparações. Ela é composta por uma aparelhagem que consiste de uma cuba de vidro de parede dupla que possui em seu interior uma câmara muscular, com capacidade variável entre 5 e 50 mL, conectada a uma serpentina helicoidal por onde desloca-se o líquido nutritivo. Esta serpentina helicoidal encontra-se banhada com água aquecida a 37°C, a qual é impulsionada por uma bomba de circulação. O órgão ou tecido isolado é mantido dentro da câmara muscular. Uma de suas extremidades é fixada em uma haste de vidro conectada a uma bomba de ar que proporciona aeração da solução nutritiva, e a outra extremidade, fixada a uma alavanca, é conectada a um transdutor de força por uma linha de algodão.<sup>23,24</sup>

A partir daí os experimentos envolvem adição de drogas em doses cumulativas à câmara muscular ou estimulação elétrica (quando o órgão é fixado entre dois eletrodos de platina conectados a um estimulador elétrico), que resultam na contração ou relaxamento do músculo em estudo. As mudanças de tensão são registradas em miógrafos (quimógrafos, fisiógrafos ou sistemas de aquisição digital),<sup>1</sup> os quais registram a intensidade e a cinética dos diferentes estágios da contração (velocidade, frequência ou decaimento). A partir dos resultados experimentais, curvas de resposta à dose ou ao estímulo são geradas.<sup>23</sup> Quando a curva dose-resposta desloca-se para a direita, significa que há um comprometimento da liberação de EDRF/NO pelo endotélio.<sup>25</sup>

Essa técnica é importante, pois proporciona o controle total do ambiente de experimentação (solução nutritiva, temperatura controlada, etc) e é capaz de isolar elementos da função endotelial usando, por exemplo, inibidores da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), como L-NAME. Outras vantagens do método incluem o preparo relativamente simples, o que permite múltiplas preparações simultaneamente; a possibilidade do uso de estimulação elétrica; e quantificação precisa da resposta.<sup>23</sup>

Uma desvantagem desse método é que sua utilização é restrita à experimentação animal, devido a considerações éticas que limitam a disponibilidade e a quantidade de amostras humanas e à variabilidade das respostas relacionadas com eventos controlados nos pacientes. Outra desvantagem seria a necessidade de utilizar um tamanho relativamente grande do tecido (> 1 mm de diâmetro), o que inviabiliza a avaliação de vasos com diâmetro menores.<sup>23</sup> Apesar de ser a metodologia mais amplamente utilizada para o estudo

da função endotelial em modelos animais, ela apresenta a limitação de não distinguir os fenômenos biológicos que ocorrem no lúmen e no exterior do vaso sanguíneo.

## Análises *in vivo*

### Dilatação mediada pelo fluxo (DMF)

Importantes evidências sugerem que a detecção da disfunção endotelial na artéria braquial atua como um importante indicador de disfunção endotelial sistêmica.<sup>26</sup> A função vascular pode ser medida de diversas formas, tanto com a utilização de técnicas invasivas como métodos não invasivos.<sup>27</sup>

As técnicas invasivas envolvem principalmente a administração intra-arterial de substâncias que promovem o aumento da liberação de NO que, por sua vez, induz a dilatação dos leitos vasculares investigados em indivíduos saudáveis. A observação de vasoconstrição nessas situações indica possível disfunção endotelial.<sup>28</sup> Todavia, por sua natureza invasiva, apresentam como desvantagem a dificuldade de utilização generalizada na população. Dessa forma, o desenvolvimento e a utilização de métodos não invasivos tornam-se mais práticos e acessíveis para determinação da função vascular.<sup>27</sup>

Dentre as inúmeras técnicas não invasivas de determinação da função vascular, uma que desponta como a mais utilizada e mais importante, combina o imageamento de artérias (principalmente da artéria braquial) em resposta a uma hiperemia reativa, induzindo aumento de fluxo local e esperada dilatação dependente de endotélio.<sup>22,27</sup> Nesta técnica, com auxílio de manguito pneumático ou torniquete, vasos distais da mão ou do antebraço são ocluídos por determinado tempo, seguido da liberação dos aparatos de oclusão. Essa liberação resultará em hiperemia reativa nos leitos vasculares distais e proximais, consequência de uma dilatação local, mediada pela liberação de alguns fatores, como o NO.<sup>29</sup> O aumento do fluxo nas artérias proximais, como a braquial, é resultado do aumento do estresse de cisalhamento e da dilatação induzida pelo NO.<sup>22</sup> A esta resposta, dá-se o nome de dilatação mediada pelo fluxo (DMF). Classicamente, a técnica envolve o imageamento de artérias com auxílio de um ultrassom durante duas condições: durante o repouso (medidas basais) e durante a hiperemia reativa (após um período de 5 minutos de oclusão arterial).<sup>27,30</sup>

A DMF na artéria braquial é uma medida indireta de liberação do NO pelo endotélio a partir de um estímulo

transiente de fluxo sanguíneo.<sup>31</sup> A dependência da DMF pelo NO foi mostrada por meio da infusão intra-arterial de um inibidor específico da eNOS, a Ng-mono-metil-L-arginina (L-NMMA), que reduziu em aproximadamente 66% a dilatação arterial em resposta ao estresse de cisalhamento.<sup>32</sup>

Tem sido proposta uma relação proporcional entre a magnitude da dilatação mediada com a função endotelial.<sup>22</sup> Uma DMF prejudicada é considerada uma das primeiras manifestações potencialmente reversíveis de doença vascular, e pode resultar em uma importante medida do impacto de danos ao endotélio.<sup>33</sup> Além disso, a disfunção endotelial detectada pela DMF tem potencial em predizer um fator de risco mesmo na ausência de diagnóstico para doenças coronarianas.<sup>26,34</sup> Nesse sentido, a determinação da DMF tem sido proposta como uma técnica com potencial aplicabilidade clínica na identificação de fatores de risco para eventos cardiovasculares, mesmo em pacientes assintomáticos.<sup>35</sup>

A determinação da DMF tem capacidade de estratificar os indivíduos em baixo, moderado ou alto risco para futuros eventos cardiometabólicos.<sup>31</sup> Para Gokce et al.,<sup>36</sup> uma prejudicada DMF tem valor prognóstico a longo prazo e sugerem que a técnica pode ser utilizada na tomada de decisões terapêuticas sobre determinado paciente. Baseado nisso, estudos mostraram uma associação entre uma deficiente DMF com o aumento de fatores de riscos de eventos cardiovasculares.<sup>34-36</sup>

Sob perspectivas metodológicas, alguns cuidados devem ser levados em consideração durante a determinação da DMF. Por causa de variações na magnitude de dilatação entre períodos pós-prandiais, principalmente após refeições ricas em lipídeos e momentos de jejum ou, ainda, durante o ciclo menstrual, é recomendado que os estudos que investiguem a DMF sejam conduzidos com pacientes em jejum e mulheres na fase folicular do ciclo menstrual.<sup>33</sup>

Contudo, assim como outras técnicas, a avaliação da DMF apresenta algumas limitações que devem ser levadas em consideração. Primeiramente, a falta de padronização e variações no posicionamento dos manguitos nos punhos/braços e nos diâmetros dos vasos dificultam a comparação dos resultados com outros achados. Além disso, em determinadas condições de doenças, o grau de hiperemia reativa pode sofrer variação mesmo sob estímulos similares. Ainda, alterações nas estruturas dos vasos sanguíneos e uma dilatação

prejudicada podem atuar como fatores limitantes durante a técnica de DMF.<sup>1</sup> Vale ressaltar que se trata de uma técnica altamente avaliador-dependente, o que pode levar a diferentes valores de DMF.

### Fluxometria por laser Doppler (FLD)

A fluxometria por laser Doppler (FLD) é uma excelente técnica para mensuração da microcirculação cutânea.<sup>37,38</sup> É baseada na medição do efeito doppler causado pela refração de uma luz emitida em frequência conhecida sobre as células vermelhas do sangue em movimentação.<sup>22</sup> A FLD é amplamente utilizada por se tratar de uma técnica não invasiva, simples de ser aplicada e por permitir medições contínuas.<sup>37</sup> FLD não determina diretamente o fluxo sanguíneo local, mas fornece um índice de perfusão cutânea.

Esta técnica é baseada na difusão e refração de um feixe de luz monocromática. O feixe de luz sofre mudanças em seu comprimento de onda (efeito doppler) quando se choca com células vermelhas sanguíneas que estão em constante movimentação.<sup>38</sup> A frequência e a magnitude da mudança do comprimento de onda do feixe de luz têm associação com a velocidade dos glóbulos vermelhos e com a quantidade dessas células. A maioria dos equipamentos utiliza um comprimento de onda de 780 nanômetros, suficientes para penetrar na pele de qualquer indivíduo, independentemente de cor ou saturação de oxigênio.<sup>38,39</sup>

Quando combinada a outras técnicas, como a infusão de substâncias vasoativas com efeito local, a iontoforese de pequenas moléculas carregadas ou técnicas que induzam hiperemia reativa, a FLD tem sido utilizada para determinação de mudanças na microcirculação da pele em tempo real.<sup>22</sup> Por exemplo, a administração intradérmica de ACh por iontoforese induz dilatação dependente de endotélio que combinada com a FLD permite quantificar o fluxo sanguíneo da região.<sup>40</sup>

A FLD apresenta boa precisão para quantificar rápidas alterações no fluxo sanguíneo cutâneo. Todavia, a heterogeneidade característica desse tecido, devido a diferenças em sua anatomia, promove uma variabilidade espacial, que contribui para uma relativa baixa qualidade na reprodutibilidade da técnica. Por outro lado, o uso de probes integrados auxilia na diminuição da variabilidade espacial, permitindo aumentos na reprodutibilidade.<sup>38</sup> Outra vantagem desta técnica é seu caráter não invasivo; mesmo quando acoplada à infusão intradérmica, a técnica é relativamente segura, dada a

pequena quantidade de droga infundida. Esta técnica apresenta menor complexidade do que a DMF, porém com um bom potencial de relevância clínica para testar a saúde vascular.<sup>22</sup>

### Pletismografia por oclusão venosa (POV)

A pletismografia por oclusão venosa (POV) começou a ser estudada há mais de 90 anos e o seu objetivo inicial era avaliar o fluxo sanguíneo em órgãos.<sup>41</sup> Atualmente, a POV vem sendo amplamente utilizada em estudos que investigam a função endotelial, avaliando a ação do sistema nervoso autônomo na regulação do fluxo sanguíneo, assim como a resposta vasodilatadora frente a estímulos diversos como, por exemplo, o exercício e o estresse mental.<sup>41,42</sup> Por ser um método de fácil aplicabilidade, a POV é muito utilizada no estudo da fisiologia vascular em humanos *in vivo*, tanto em indivíduos saudáveis quanto em diversas situações patológicas.<sup>43</sup>

O procedimento não invasivo de POV consiste na colocação de um manguito pneumático na porção superior do braço do indivíduo, e inflado a uma pressão inferior a pressão diastólica. Geralmente utiliza-se uma pressão em torno 40 mmHg, sendo o manguito inflado intermitentemente durante aproximadamente 10 segundos e desinflado por 5 segundos. Esse procedimento dura em torno de 2 a 3 minutos.<sup>44,45</sup>

A pressão gerada por essa manobra é suficiente para manter o fluxo arterial em direção ao antebraço, porém impossibilita o retorno venoso, o que acarreta no aumento do volume do membro. Tal aumento é linear e captado por meio de um sensor silástico (*strain gauge*) que é posicionado no ponto de maior volume do antebraço. Esse sensor é preenchido com mercúrio e é capaz de medir qualquer alteração no volume tecidual.<sup>43</sup>

O indivíduo em situação de repouso apresenta o fluxo sanguíneo no antebraço que se divide em, aproximadamente, 70% no músculo estriado esquelético e 30% na pele. A mão possui inúmeras comunicações arteriovenosas relacionadas à irrigação da pele. Para que isso não influencie na medida de fluxo no antebraço, é posicionado um manguito inferior em torno do punho é inflado a uma pressão supra sistólica momentos antes da medida.<sup>42,43,46,47</sup>

A variação no volume do membro proveniente da manobra é utilizada para avaliar a responsividade do vaso. Esse estímulo pode ser mecânico, promovendo hiperemia

reativa, ou por via química e invasiva, pela administração de substâncias vasoativas. A resposta prejudicada ou diminuída pode ser um indício de disfunção endotelial.<sup>48</sup> A disfunção endotelial é considerada um fator crítico no desenvolvimento, progressão e complicações para a doença arterial coronariana.<sup>49</sup> A função endotelial, quando preservada, funciona como um importante regulador de inflamação vascular e remodelamento.<sup>43,47,48,50</sup>

A vasodilatação endotélio-dependente pode ser mensurada por meio da hiperemia reativa que é estimulada por meio de um manguito posicionado no braço e inflado uma pressão supra sistólica conforme descrito acima. Esse estímulo induz a produção de vasodilatadores, principalmente NO, a partir da microvasculatura, aumentando a velocidade do fluxo. O estresse de cisalhamento provocado pelo atrito do sangue com a parede do vaso promove vasodilatação. Posteriormente, o manguito é liberado rapidamente e as variações nos vasos são medidas.<sup>50</sup> Outra forma de se medir essa resposta é por meio da infusão de ACh, que atua como agonista de receptores muscarínicos localizados no endotélio, e usada para avaliar vasodilatação dependente do endotélio. Geralmente são infundidas doses crescentes durante 5 minutos e a medida de fluxo sanguíneo no antebraço, dada por mL.100mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> tecidual, é verificada nos dois últimos minutos da infusão.<sup>43,47</sup>

Já a vasodilatação endotélio-independente é avaliada pela infusão de substâncias vasoativas precursoras de NO, como o nitroprussiato de sódio. Os *strain gauges* vão identificar a variação vascular confirmar se houve uma resposta adequada ou não. Quando a resposta condiz com o estímulo, podemos afirmar que a função endotelial está preservada.<sup>43</sup>

A POV, quando realizada de forma invasiva utilizando a infusão intra-arterial de substâncias vasoativas, é considerada como ferramenta padrão-ouro para a análise do comportamento vascular. Porém, isso inviabiliza a sua realização em grande escala na prática clínica.

### Velocidade de onda de pulso (VOP)

Ao fim da ejeção ventricular, é gerada uma onda de pressão que se propaga do coração para a periferia em determinada velocidade. A medida dessa velocidade é denominada velocidade de onda de pulso (VOP).<sup>51</sup> Alguns autores definem a VOP como a distância percorrida pelo fluxo sanguíneo dividida pelo tempo necessário para percorrer tal distância, dada em metros/segundos.<sup>52</sup>

A VOP tem sido adotada como um importante marcador de risco cardiovascular.<sup>53</sup> Assim, quanto menor a VOP, mais elástico e saudável se encontra o vaso. Porém, quando o vaso apresenta um alto nível de rigidez, ocorre um aumento na propagação das ondas de pulso na artéria aorta e grandes vasos, além de causar um retorno precoce das ondas de pulso refletidas da periferia.<sup>54</sup> A onda de pulso é normalmente refletida em qualquer ponto de descontinuidade da árvore arterial, causando uma onda retrógrada na aorta ascendente. Esse retorno antecipado, ainda no final da sístole, promove uma sobrecarga no trabalho cardíaco.<sup>51</sup>

A associação entre a rigidez arterial e fatores de risco como doença arterial coronariana, diabetes mellitus, hipertensão arterial, disfunção diastólica e idade já está bem estabelecida.<sup>51</sup> Um indivíduo jovem saudável apresenta valores reduzidos de VOP, porém, com o avançar da idade as propriedades elásticas dos vasos reduzem, aumentando os valores de VOP.<sup>55</sup> Ainda existem controvérsias quanto aos valores de VOP e risco cardiovascular, porém, valores maiores que 12 m/s são tidos como “ponto de corte”.<sup>51</sup>

Existem diferentes técnicas para mensuração da VOP, porém a forma estabelecida na literatura como padrão ouro é a relação carótida-femoral por expressar valores diretamente relacionados a artéria aorta e por ser um método não invasivo.<sup>56-58</sup> Essa técnica é realizada com o indivíduo em posição supina, e dois transdutores são posicionados, um na artéria carótida comum direita e outro na artéria femoral direita. A diferença de tempo entre o início da onda de pulso carotídeo e o início da onda de pulso femoral, e a medida da distância entre os transdutores são utilizados para calcular a VOP.<sup>51,57,58</sup>

Outro método amplamente recomendado para a análise das ondas de pulso é a tonometria de aplanção. Essa técnica é utilizada para estimar a onda de pressão aórtica a partir da onda de pressão na artéria carótida comum ou radial. O uso da tonometria da artéria radial é mais recomendado devido ao suporte da estrutura óssea no local, o que facilita a medida. Para a sua realização, é utilizado um transdutor posicionado na pele no local mais proeminente do vaso. Os sinais da onda pressão são captados pelo aparelho e posteriormente é aplicada uma função de transferência para calcular a onda de pressão da aorta.<sup>57</sup>

A rigidez arterial representa um forte indício de doença cardiovascular, o que justifica o uso da análise de onda de pulso na prática clínica, identificando

alterações nos vasos que possam estar diretamente relacionados à saúde vascular mesmo antes do aparecimento de sinais ou sintomas.<sup>58</sup>

Possíveis limitações da técnica estão relacionadas à existência de comorbidades associadas como síndrome metabólica, obesidade e diabetes, o que pode prejudicar o registro da onda de pressão femoral. Além disso, homens com obesidade abdominal e mulheres com grande volume do busto podem ocasionar erro na determinação da distância entre os pontos de medida.<sup>57</sup>

### Marcadores séricos de disfunção endotelial

Biomarcadores são ferramentas analíticas usadas para avaliar parâmetros biológicos. Em 2001, um grupo de trabalho do *National Institutes of Health* (NIH) padronizou a definição de biomarcador, ou marcadores biológicos, como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas para uma intervenção terapêutica”. Atualmente, são utilizados como ferramenta para: 1) identificação de indivíduos sob alto risco; 2) diagnóstico rápido e preciso em condições de doença; 3) prognóstico e tratamento eficazes. Independentemente de sua finalidade, um biomarcador apresenta relevância clínica quando apresenta as seguintes características: precisão; padronização e reprodutibilidade; adequação ao paciente; fácil interpretação por clínicos; e alta sensibilidade e/ou especificidade pelo parâmetro que se propõe a identificar.<sup>59</sup>

O uso de biomarcadores séricos para avaliação da função endotelial apresenta vantagens devido à relativa simplicidade dos procedimentos e ao fato de que amostras de sangue venoso são amplamente utilizadas na rotina laboratorial. A utilização desses marcadores biológicos para avaliação do prognóstico e/ou diagnóstico de doenças vasculares ainda está em um estágio inicial de desenvolvimento, mas essa área de atuação apresenta um grande potencial.<sup>1</sup>

### Moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina)

As células endoteliais desempenham um papel chave no transporte de células e substratos metabólicos entre o sangue e o espaço intersticial, incluindo um complexo sistema de sinalização que regula respostas imunes inatas do leito vascular. Quando essas células são ativadas por estímulos pró-inflamatórios, tais como

endotoxinas bacterianas, interleucina 1B (IL-1B), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteína C reativa (PCR), LDL-ox ou por forças hemodinâmicas relacionadas ao fluxo sanguíneo, a expressão de moléculas de adesão é aumentada e, portanto, são consideradas marcadores precoces de ativação endotelial e inflamação sistêmica.<sup>60</sup>

A migração transendotelial de leucócitos é regulada por moléculas de adesão celular solúveis, tais como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas. A ICAM-1 é membro da superfamília de imunoglobulinas e ligante para integrinas  $\beta$ 2 de moléculas presentes em leucócitos<sup>61</sup> e é altamente expressa em células endoteliais e macrófagos subendoteliais.<sup>62</sup> A ICAM-1 participa da mediação de uma série de interações célula-célula, incluindo a adesão e transmigração de leucócitos na parede do endotélio vascular. Dados da literatura suportam a hipótese de que a expressão de ICAM-1 leva à ativação células endoteliais e a inflamação que, por sua vez, são passos importantes na iniciação e progressão da aterosclerose.<sup>63</sup>

A VCAM-1 também pertence à superfamília de imunoglobulinas e é um ligante do antígeno-4 muito tardio, uma  $\beta$ -integrina encontrada apenas na superfície de células mononucleares.<sup>64</sup> Sua expressão é predominantemente restrita a células endoteliais e células fusiformes ocasionais. De forma contrária a ICAM-1, que é produzida em baixos níveis, a VCAM-1 não é expressa no endotélio saudável.<sup>62</sup> Supõe-se que a expressão de VCAM-1 pode resultar da ativação endotelial, uma vez que aumenta o recrutamento local de monócitos e melhora a interação monócito-endotélio durante a iniciação da formação de lesões ateroscleróticas.<sup>65</sup>

A E-selectina, molécula pertence à família das lectinas do tipo C, é provavelmente a mais específica dentre os marcadores de ativação endotelial.<sup>66,67</sup> Sua expressão é restrita ao endotélio vascular e induzida por citocinas inflamatórias. Essa molécula de adesão desempenha um papel importante no recrutamento de leucócitos para o local da inflamação e, medeia a rolagem de leucócitos em vasos sanguíneos inflamados.<sup>67</sup>

### Marcadores inflamatórios

Ao longo dos últimos anos, evidências têm demonstrado que a inflamação está intimamente relacionada com a patogênese da aterosclerose e suas complicações. PCR, ligante de CD40 (CD40L), IL-18, proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), entre outros, são marcadores inflamatórios que resultam na ativação endotelial.<sup>68</sup> Fortes evidências científicas

indicam que a ativação inflamatória é uma importante via no desenvolvimento e progressão de aterosclerose. A cascata inflamatória está envolvida durante todo o processo de formação da placa aterosclerótica, desde as fases iniciais de disfunção endotelial até o desenvolvimento de síndromes coronárias agudas.<sup>69</sup>

### Interleucina-18 (IL-18)

A interleucina-18 (IL-18), membro da família de citocinas IL-1, é altamente expressa em placas ateroscleróticas e se localiza principalmente em macrófagos residentes nessas áreas. O aumento da expressão de IL-18 está associado diretamente ao desenvolvimento da disfunção endotelial, uma vez que essa interleucina promove aumento na expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular.<sup>68</sup>

### Proteína-C Reativa (PCR)

A PCR é pentraxina circulante composta de cinco subunidades idênticas dispostas na forma de um pentâmero cíclico, que desempenha um papel importante na resposta imune inata humana.<sup>70</sup> Pesquisas nos últimos 20 anos sugerem que a PCR pode apresentar capacidade pró-aterogênica e afetar diretamente a expressão de moléculas de adesão e a fibrinólise, atuando, assim no processo inflamatório em células endoteliais no desenvolvimento da disfunção endotelial.<sup>71-73</sup>

Esses estudos demonstram que a PCR promove ativação endotelial por meio da expressão de ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas e MCP-1 e, ainda, ativa macrófagos que expressam citocinas e fatores teciduais, promovendo um aumento da absorção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por outras lipoproteínas.<sup>73</sup> Verificou-se também que a PCR modula negativamente a produção de fatores vasoativos derivados do endotélio, principalmente o NO, principal controlador da homeostase vascular. Esse processo pode facilitar a ocorrência de apoptose nas células endoteliais e atenuar mecanismos compensatórios importantes para a angiogênese.<sup>71</sup>

Paralelamente, a PCR tem capacidade de acentuar a produção da endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor dependente do endotélio, e da IL-6, uma citocina pró-inflamatória chave.<sup>72</sup> Todos esses dados corroboram com a ideia de que a PCR é preditora de aterosclerose e morte vascular. Sua concentração sérica pode refletir a saúde endotelial, uma vez que essa proteína tem capacidade de alterar o fenótipo de células endoteliais

e, assim, contribuir para a formação da lesão, ruptura da placa e trombose coronária. Portanto, além de atuar como um biomarcador inflamatório, a PCR também é considerada um mediador de doença vascular.<sup>60</sup>

### Ligante de CD40 (CD40L)

O ligante CD40 (CD40L), que pode se apresentar na forma livre ou solúvel, é uma proteína transmembrana de tipo II que pertence à superfamília do TNF e compõe uma via fisiopatológica intimamente envolvida na inflamação e na aterogênese.<sup>74</sup> O CD40L origina-se principalmente de plaquetas que, apesar de serem essenciais para a hemostasia, também têm potencial para iniciar uma resposta inflamatória na parede vascular.<sup>75</sup> Uma vez ativadas, plaquetas prontamente expressam CD40L e o aparecimento dessa molécula em sua superfície induz as células endoteliais a secretar quimiocinas e expressar moléculas de adesão, promovendo, assim, o recrutamento e extravasamento de leucócitos no local da lesão.<sup>76</sup>

CD40L pode rapidamente desprender-se da membrana plaquetária, apresentando-se na forma solúvel. Ambas as formas têm atividade pró-trombótica e pró-inflamatória, aumentando a ativação e agregação plaquetária e a conjugação de plaquetas-leucócitos e leucócito-endotélio. Ainda, aumentam a libertação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio a partir de plaquetas estimuladas.<sup>77</sup> Resumindo, esse sistema de ativação de CD40L promove um estado inflamatório crônico na parede vascular e isso contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial, aterogênese e suas respectivas complicações.<sup>74</sup>

### Proteína quimiotática de monócitos (MCP-1)

Uma vez aderidos à parede vascular devido à ação das moléculas de adesão celular, os monócitos migram do endotélio para a camada íntima, a mais interna da parede vascular. Essa migração de monócitos é mediada por um gradiente de concentração de MCP-1, a partir da interação dessa molécula com os receptores CCR2 de monócitos. Uma vez no interior da camada íntima, os monócitos desenvolvem-se em macrófagos e começam a expressar receptores antioxidantes, tais como SR-A, CD36 e LOX-1, que internalizam lipoproteínas modificadas. Essa internalização dá origem a macrófagos ou células espumosas que transportam lipídios, os quais caracterizam as lesões ateroscleróticas precoces.<sup>78</sup>

Estudos mostram que a MCP-1 induz o recrutamento de monócitos após lesão endotelial, e esse dano parece ser necessário para o aparecimento local dessa molécula e sua expressão sobre plaquetas aderentes. Portanto, a expressão de MCP-1 após a lesão vascular é um mecanismo altamente especializado, que desempenha um papel decisivo no remodelamento vascular em situações de injúria. A dosagem do seu nível plasmático pode refletir o grau de disfunção e comprometimento do endotélio vascular.<sup>78</sup>

### Células endoteliais circulantes (CEC) e micropartículas endoteliais (MPE)

A função endotelial reflete o balanço entre lesão e reparação do endotélio vascular. Essa relação levou ao desenvolvimento de ensaios para quantificar o descolamento das células endoteliais maduras e de micropartículas derivadas para representar o grau de dano. Células endoteliais circulantes (CEC), que se desprendem quando há ativação ou perda de integridade do endotélio vascular, podem ser medidas na circulação por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Uma vez iniciado o processo de apoptose endotelial, ocorre aumento abrupto da liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático, fazendo com que a membrana celular saia do estado repouso.<sup>54</sup> Dados da literatura sugerem que há uma relação direta entre o aumento do número CEC na circulação periférica e a extensão da lesão endotelial em pacientes com doença aterosclerótica e inflamação vascular.<sup>78</sup>

Micropartículas endoteliais (MPE) são pequenas vesículas formadas e liberadas pela membrana celular de CEC ativadas ou danificadas em resposta a ativação e/ou apoptose.<sup>78</sup> Ao se desprender de suas células de origem, as MPE carregam em sua superfície moléculas de adesão, enzimas e receptores, além de expressarem uma variedade de antígenos constitutivos,<sup>53</sup> e portanto, sua composição pode ser utilizada para caracterizar o estado da célula endotelial progenitora. Em condições normais, a ativação endotelial – quando o endotélio sai de seu estado basal e passa a expressar citocinas e moléculas de adesão, desencadeando mecanismos inflamatórios – mantém-se local, discreta e reversível, de forma que MPE circulantes são dificilmente encontradas. Já níveis elevados de MPE foram observados em uma variedade de condições associadas com a ativação endotelial ou à apoptose,<sup>66</sup> indicando que MPE estão diretamente relacionadas com a trombogênese e formação da placa de ateroma,<sup>55</sup> participando ainda nos processos de inflamação, dano vascular e angiogênese.<sup>54</sup>

## Mieloperoxidase (MPO) e espécies reativas de oxigênio (EROs)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima membro da superfamília heme peroxidases, liberada por neutrófilos ativados, monócitos e macrófagos teciduais, que catalisam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS).<sup>60</sup> Além de sua importância no combate a doenças infecciosas, a MPO é cada vez mais reconhecida pelo seu papel no início e progressão da aterosclerose.<sup>7,79</sup> A MPO liga-se a glicosaminoglicanas nas paredes vasculares e, nessa circunstância, prejudica a liberação de NO derivada do endotélio e função endotelial local.<sup>7</sup>

Produtos da atividade das MPO, como ácido hipocloroso, radical tirosil e dióxido de nitrogênio, reagem com peróxido de hidrogênio e podem contribuir para a ocorrência de danos oxidativos em lipídeos e proteínas do organismo. Portanto, os dados da literatura corroboram a ideia de que níveis de MPO podem prever o desenvolvimento da disfunção endotelial e doença arterial coronariana, enquanto baixos níveis plasmáticos e determinados polimorfismos específicos de MPO foram descritos como cardioprotetores.<sup>60,79</sup>

Por sua vez, o estresse oxidativo pode promover a disfunção endotelial por uma série de mecanismos, mas a via predominante envolve a redução da biodisponibilidade de NO. Em determinadas circunstâncias, a produção crônica de EROs pode exceder a capacidade antioxidante enzimática e não enzimática e, conseqüentemente, ocorrer um aumento dos níveis de biomoléculas oxidadas e os possíveis danos teciduais associados. Evidências sugerem que o estresse oxidativo tem um papel central na aterogênese e que poderia desempenhar esse papel por meio do desenvolvimento e progressão da disfunção endotelial.<sup>66</sup>

## Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), também conhecido por fator de permeabilidade vascular, é amplamente conhecido por seu papel na angiogênese, estimulando a proliferação e migração de células endoteliais, além de aumentar a permeabilidade vascular. Esse fator é secretado por vários tipos celulares diferentes, incluindo as células endoteliais. VEGF liga-se principalmente a receptores tirosina-quinase de superfície celular denominados VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3.<sup>80</sup> Dentre esses receptores, o VEGFR-2 destaca-se no que diz respeito à avaliação da função endotelial, pois sua expressão é restrita às células do

endotélio vascular. Esse receptor desempenha um papel significativo na migração celular, vasodilatação dependente do endotélio e angiogênese.

A ativação de VEGFR-2 ocorre a partir da ligação com VEGF ou por aumento da taxa de cisalhamento do fluxo sanguíneo, que desencadeia uma cascata de sinalização e ativação das vias MEK-MAPK (proliferação e migração), PI3K-Akt (sobrevivência) e de Src e NOS (permeabilidade). Em adultos, VEGFR2 é fisiologicamente detectável em quantidades baixas na vasculatura e, em situações adversas (como crescimento tumoral, reparação de feridas e em doenças inflamatórias) participa do processo de revascularização local.<sup>80</sup>

## Outros

LDL-oxs são moléculas pró-inflamatórias e imunogênicas que podem afetar uma grande variedade de processos ateroscleróticos a partir de eventos precoces, tais como a expressão da molécula de adesão e ativação do sistema imunitário, até eventos posteriores, tais como a agregação plaquetária e desestabilização da placa aterosclerótica.<sup>7</sup> A LDL-ox é formada por processos oxidativos durante a migração das partículas de LDL na parede dos vasos sanguíneos e, recentemente, tem sido proposta como marcador de disfunção endotelial e aterogênese.<sup>68</sup>

Outro marcador da saúde endotelial são os ácidos graxos livres (AGLs). AGLs podem elevar os níveis de EROS a partir da produção de citocinas em células mononucleares. Além disso, podem induzir a ativação de vias pró-inflamatórias de NF- $\kappa$ B em células endoteliais humanas. Graças a essas características, os AGLs são considerados um biomarcador precoce para lesão endotelial e aterosclerose, apresentando implicações importantes para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.<sup>60</sup>

As conseqüências pró-coagulantes da ativação endotelial podem ser mensuradas por alterações no equilíbrio entre o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e do seu inibidor endógeno, o inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1). Além disso, o fator de von Willebrand, uma glicoproteína amplamente liberada pelo endotélio ativo, apresenta um papel adicional na ativação celular, na promoção da coagulação e na ativação de plaquetas. Além desses fatores, o fibrinogênio também pode ser considerado um biomarcador de função endotelial. Essa glicoproteína é sintetizada principalmente nas células hepáticas e em

megacariócitos, e pode se ligar a proteínas da superfície da glicoproteína (GP) IIb / IIIa, criando pontes entre as plaquetas. O fibrinogênio estimula a migração de células de músculo liso, promove a agregação de plaquetas e aumenta a viscosidade no sangue e, portanto, é associado com o desenvolvimento inicial da aterosclerose.<sup>66</sup>

## Conclusão

Evidências mostram a importância da disfunção endotelial para o desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares. Inúmeros são os métodos para investigação da função da endotelial, sendo estes *in vivo* ou *in vitro*, invasivos ou não invasivos. Vale ressaltar que essas técnicas são amplamente utilizadas no âmbito da pesquisa clínica, porém os mesmos ainda não são utilizados em diagnósticos, por serem muito invasivas, muito caras ou difíceis de serem padronizadas. Ressaltamos, assim, a importância de mais estudos e investimentos na área a fim de torná-las aplicáveis na prática clínica e, com isso, minimizar problemas de saúde pública relacionados a doenças cardiovasculares, por meio do diagnóstico precoce de disfunção endotelial.

## Limitações

O presente artigo trata-se de uma revisão de literatura narrativa e, portanto, não apresenta uma metodologia de confecção estabelecida e reprodutível, ficando a cargo dos autores a identificação e seleção de estudos, sua análise e interpretação. Porém, ressalta-se que o objetivo dessa revisão é fornecer uma atualização sobre os métodos atualmente utilizados para avaliar

função endotelial, e apontar novas perspectivas nessa área do conhecimento.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Ciências do Exercício (LACE) da Universidade Federal Fluminense (UFF) por todo suporte dado durante a elaboração do presente estudo.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Storch AS, Mattos JD, Alves R, Galdino IS, Rocha HNM. Obtenção de dados: Storch AS, Mattos JD, Alves R, Galdino IS, Rocha HNM. Análise e interpretação dos dados: Storch AS, Mattos JD, Alves R, Galdino IS, Rocha HNM. Redação do manuscrito: Storch AS, Mattos JD, Alves R, Galdino IS, Rocha HNM. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Storch AS, Mattos JD, Alves R, Galdino IS, Rocha HNM.

## Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado por CAPES, FAPERJ, CNPq.

## Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

## Referências

1. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(9):1631-74.
2. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108(17):2054-9.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
4. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5.
5. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(7):1149-60.
6. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *Biomed Res Int*. 2014;2014:801896.
7. Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep*. 2007;7(4):257-64.
8. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171(3):223-9.
9. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94(6):1298-303.
10. Relou IA, Damen CA, van der Schaft DW, Groenewegen G, Griffioen AW. Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue Cell*. 1998;30(5):525-30.

11. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;106(5):1525-31.
12. Farcas MA, Rouleau L, Fraser R, Leask RL. The development of 3-D, in vitro, endothelial culture models for the study of coronary artery disease. *Biomed Eng Online*. 2009 Oct 28;8:30.
13. Marin V, Kaplanski G, Gres S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 2001;254(1-2):183-90.
14. Park HJ, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, Galper JB. Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis. *Stem Cell Rev*. 2006;2(2):93-102.
15. Geerts WJ, Vocking K, Schoonen N, Haarbosch L, van Donselaar EG, Regan-Klapisz E, et al. Cobblestone HUVECs: a human model system for studying primary ciliogenesis. *J Struct Biol*. 2011;176(3):350-9.
16. Regan-Klapisz E, Krouwer V, Langelaar-Makkinje M, Nallan L, Gelb M, Gerritsen H, et al. Golgi-associated cPLA2alpha regulates endothelial cell-cell junction integrity by controlling the trafficking of transmembrane junction proteins. *Mol Biol Cell*. 2009;20(19):4225-34.
17. Zhang W, DeMattia JA, Song H, Couldwell WT. Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions. *J Neurosurg*. 2003;98(4):846-53.
18. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989;243(4895):1160-5.
19. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(41):14871-6.
20. Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, et al. Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest*. 2006;116(1):49-58.
21. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;232(3):708-16.
22. Brocq ML, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(9):1631-74.
23. Musial DC, da Silva Jr ED. A técnica de banho de órgão isolado para estudos farmacológicos. *SaBios-Rev Saúde Biol*. 2015;10(2):86-9.
24. Pharmacological experiments on isolated preparations. Edinburgh: University of Edinburgh. Dept. Pharmacology/Churchill Livingstone; 1970.
25. Evora P, Pearson P, Secombe J, Discigil B, Schaff H. Experimental methods in the study of endothelial function. *Arq Bras Cardiol*. 1996;66(5):291-7.
26. Kizhakekuttu TJ, Gutterman DD, Phillips SA, Jurva JW, Arthur EI, Das E, et al. Measuring FMD in the brachial artery: how important is QRS gating? *J Appl Physiol*. 2010;109(4):959-65.
27. Celermajer DS, Sorensen K, Gooch V, Sullivan I, Lloyd J, Deanfield J, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.
28. Raitakari OT, Celermajer DS. Research methods in human cardiovascular pharmacology edited by Dr S. Maxwell and Prof. D. Webb flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(5):397-404.
29. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuille C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-9.
30. Patel S, Celermajer DS. Assessment of vascular disease using arterial flow mediated dilatation. *Pharmacol Rep*. 2006;58(Suppl 1):3-7.
31. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, et al. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study of the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120(6):502-9.
32. Ghiadoni L, Versari D, Magagna A, Kardasz I, Plantinga Y, Giannarelli C, et al. Ramipril dose-dependently increases nitric oxide availability in the radial artery of essential hypertension patients. *J Hypertens*. 2007;25(2):361-6.
33. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74(3):247-53.
34. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(4):616-23.
35. Shimbo D, Grahame-Clarke C, Miyake Y, Rodriguez C, Sciacca R, Di Tullio M, et al. The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multi-ethnic cohort. *Atherosclerosis*. 2007;192(1):197-203.
36. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(10):1769-75.
37. Eun HC. Evaluation of skin blood flow by laser Doppler flowmetry. *Clin Dermatol*. 1995;13(4):337-47.
38. Roustif M, Cracowski J-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34(7):373-84.
39. Zijlstra W, Buursma A, Meeuwssen-Van der Roest W. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clin Chem*. 1991;37(9):1633-8.
40. Farkas K, Kolossváry E, Járás Z, Nemcsik J, Farsang C. Non-invasive assessment of microvascular endothelial function by laser Doppler flowmetry in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis*. 2004;173(1):97-102.
41. Joyner MJ, Dietz NM, Shepherd JT. From Belfast to Mayo and beyond: the use and future of plethysmography to study blood flow in human limbs. *J Appl Physiol*. 2001;91(6):2431-41.
42. Munhoz RT, Negrão CE, Barretto ACP, Ochiai ME, Cardoso JN, Morgado PC, et al. Microneurografia e pletismografia de oclusão venosa na insuficiência cardíaca: correlação com prognóstico. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(1):46-53.
43. Kraemer-Aguiar LG, de Miranda ML, Bottino DA, Lima RdA, de Souza MdGC, de Moura Balarini M, et al. Increment of body mass index is positively correlated with worsening of endothelium-dependent and independent changes in forearm blood flow. *Front Physiol*. 2015 Aug 11;6:223.
44. Oyama J-i, Maeda T, Kouzuma K, Ochiai R, Tokimitsu I, Higuchi Y, et al. Green tea catechins improve human forearm endothelial dysfunction and have antiatherosclerotic effects in smokers. *Circ J*. 2010;74(3):578-88.
45. Strachan FE, Newby DE, Sciberras DG, McCrea JB, Goldberg MR, Webb DJ. Repeatability of local forearm vasoconstriction to endothelin-1 measured by venous occlusion plethysmography. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;54(4):386-94.
46. Wilkinson IB, Webb DJ. Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(6):631-46.
47. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension : a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation*. 2001;104(5):511-4.

48. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011;18(6):775-89.
49. Reriani MK, Dunlay SM, Gupta B, West CP, Rihal CS, Lerman LO, et al. Effects of statins on coronary and peripheral endothelial function in humans: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011;18(5):704-16.
50. Beck DT, Martin JS, Casey DP, Braith RW. Exercise training improves endothelial function in resistance arteries of young prehypertensives. *J Hum Hypertens.* 2014;28(5):303-9.
51. Pizzi O, Brandão AA, Magalhães MEC, Pozzan R, Brandão AP. Velocidade de onda de pulso—o método e suas implicações prognósticas na hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2006;13(1):59-62.
52. Rocha E. Velocidade da onda de pulso arterial: um marcador da rigidez arterial e a sua aplicabilidade na prática clínica. *Rev Port Cardiol.* 2011;30(9):699-702.
53. Pereira T, Maldonado J, Polónia J, Silva JA, Morais J, Marques M, et al. Definição de valores de referência da velocidade da onda de pulso arterial numa população portuguesa: uma sub-análise do projecto EDIVA. *Rev Port Cardiol.* 2011;30(9):691-8.
54. Ribeiro FA, Thoen RH, Köhler I, Danzmann LC, Torres MAR. Síndrome metabólica: complacência arterial e a velocidade de onda de pulso. *Rev AMRIGS.* 2012;56(1):75-80.
55. Vlachopoulos C, O'Rourke M. Genesis of the normal and abnormal arterial pulse. *Curr Probl Cardiol.* 2000;25(5):303-67.
56. Petersen K, Blanch N, Keogh J, Clifton P. Weight loss, dietary intake and pulse wave velocity. *Pulse.* 2015;3(2):134-40.
57. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 2006;27(21):2588-605.
58. Husmann M, Jacomella V, Thalhammer C, Amann-Vesti BR. Markers of arterial stiffness in peripheral arterial disease. *Vasa.* 2015;44:341-8.
59. Group. BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
60. Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pagès M. Circulating biomarkers. *Thromb Res.* 2012;130(Suppl 1):S12-5.
61. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1379-86.
62. de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(2):423-6.
63. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet.* 1998;351(9096):88-92.
64. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1607-38.
65. Li H, Cybulsky MI, Gimbone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(2):197-204.
66. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007;115(10):1285-95.
67. Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity.* 2007;26(4):477-89.
68. Straface E, Lista P, Gambardella L, Franconi F, Malorni W. Gender-specific features of plasmatic and circulating cell alterations as risk factors in cardiovascular disease. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(6):665-74.
69. Centurión OA. Serum biomarkers and source of inflammation in acute coronary syndromes and percutaneous coronary interventions. *Cardiovasc Revasc Med.* 2016;17(2):119-28.
70. TW DC. Function of C-reactive protein. *Ann Med.* 2000;32(4):274-8.
71. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation.* 2002;106(8):913-9.
72. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* 2002;105(16):1890-6.
73. Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation.* 2003;107(3):370-1.
74. Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2011;43(5):331-40.
75. Wenzel F, Baertl A, Zimmermann N, Hohlfeld T, Giers G, Oldenburg JA, R. Different behaviour of soluble CD40L concentrations can be reflected by variations of preanalytical conditions. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;39(1-4):417-22.
76. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391(6667):591-4.
77. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(11):2428-34.
78. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917-23.
79. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006;98(11A):9P-17P.
80. Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(8):439-54.