

Editora: Fernanda Consolim-Colombo

Função e disfunção endotelial: da fisiopatologia às perspectivas de uso em pesquisa e na prática clínica

Endothelial function and dysfunction: pathophysiology and perspectives for use in research and clinical practice

Cassiana R. G. Giribela¹, Rita Gengo^{1,2}, Valéria Hong², Fernanda M. Consolim-Colombo²

RESUMO

A alteração da função endotelial precede o desenvolvimento das alterações ateroscleróticas morfológicas e pode contribuir para o desenvolvimento da lesão e das complicações clínicas finais. Essa observação levou ao desenvolvimento de diversos métodos com o objetivo de testar os diferentes aspectos da função endotelial. Apesar da importância de seu estudo, os testes disponíveis ainda não são adequados para *screening* ou para decisão clínica individual, visto que ainda são de difícil execução e de alto custo e apresentam certa variabilidade que ainda limita seu uso na rotina clínica. Porém, deve-se ressaltar que há clara necessidade de novas estratégias de testes clínicos que possam refinar a avaliação de risco cardiovascular individualmente, portanto o estudo da função endotelial, com o avançar das pesquisas, provavelmente virá a se tornar uma ferramenta importante na avaliação do risco cardiovascular, na detecção precoce da doença, além de julgar respostas às intervenções designadas para prevenir a progressão da doença em estágios precoces e reduzir os eventos adversos tardios.

PALAVRAS-CHAVE

Endotélio, função endotelial, aterosclerose, fisiopatologia.

ABSTRACT

Changes in endothelial function precedes the development of morphological atherosclerotic changes and can also contribute to lesion development and later clinical complications. This observation has led to the development of a range of methods to test different aspects of its function. Despite the importance of endothelial function testing, it is not yet suitable for screening or individual clinical decision-making, because currently the available tests are difficult, expensive, and variable for routine clinical use. However it must be emphasized that there is a clear need for clinical testing strategies that refine risk assessment in individual subjects. In this context, in a near future, endothelial function testing will become an important diagnostic tool in cardiovascular risk evaluation, and also in early disease detection, and judgment of response to interventions designed to prevent progression of early disease, and reduce later adverse events in patients.

KEYWORDS

Endothelium, endothelial function, atherosclerosis, pathophysiology.

INTRODUÇÃO

A aterosclerose habitualmente tem seu início na infância, podendo progredir silenciosamente durante um longo estágio pré-clínico e eventualmente se manifestar clinicamente, geralmente na meia-idade. Durante os últimos 30 anos, tem ficado claro que o início e a progressão, além de sua ativação final, dependem de mudanças dinâmicas profundas na biologia vascular¹. O endotélio tem emergido como um regulador chave na homeostase vascular, e nesse papel ele não tem meramente uma função de barreira, mas também age como um transdutor ativo de sinais das alterações circulatórias que levam à modificação do fenótipo da parede do vaso². A alteração da função endotelial precede o desenvolvimento das alterações ateroscleróticas morfológicas e pode também contribuir para o desenvolvimento da lesão e das complicações clínicas finais³. A observação do papel central do endotélio no processo da doença aterosclerótica levou ao desenvolvimento de métodos com o objetivo de testar os diferentes aspectos da sua função, que incluem medidas tanto da injúria quanto do reparo endotelial. Isso providenciou não apenas novas descobertas sobre a fisiopatologia, mas também uma oportunidade clínica de detecção precoce da doença. Seu estudo possibilitou também quantificar o risco, julgar respostas às intervenções designadas para prevenir a progressão da doença em estágios precoces e reduzir os eventos adversos tardios nos pacientes⁴.

A ATIVAÇÃO ENDOTELIAL E A ATEROSCLEROSE

O que é geralmente referido como "disfunção endotelial" deveria mais apropriadamente ser considerado com ativação endotelial, que pode contribuir eventualmente para a doença arterial, principalmente em determinadas condições⁴. A ativação endotelial representa uma mudança de um fenótipo quiescente para um que envolve resposta de defesa do hospedeiro. De fato, a maioria dos fatores de risco cardiovascular leva à ativação da maquinaria molecular no endotélio, que resulta na expressão de citocinas e moléculas de adesão designadas para interagir com leucócitos e plaquetas, desencadeando mecanismos inflamatórios direcionados a tecidos específicos⁵.

A mudança fundamental envolvida nesse processo é a alteração na sinalização de um processo celular quiescente, mediado pelo óxido nítrico (NO), em direção a um estado de ativação por sinalização redox. Espécies reativas de oxigênio (ROS), na presença da superóxido dismutase, levam à geração de peróxido de hidrogênio, que, tal como o NO, pode se difundir rapidamente através da célula, reagir com os grupos cisteína nas proteínas e alterar sua função⁶. Porém, devido aos diferentes processos químicos envolvidos, isso resulta em consequências bastante diferentes, como a fosforilação dos fatores de transcrição, indução de remodelação de cromatina nuclear e transcrição gênica e ativação de protease. É intrigante que a enzima NO sintase endotelial (eNOS), que normalmente ajuda a manter o

estado quiescente do endotélio, pode mudar, direcionando sua ação para geração de ROS em determinadas circunstâncias, como parte da ativação endotelial. Isso é chamado de desacoplamento eNOS e resulta em formação de superóxido, se o cofator-chave tetra-hidrobiopterina não está presente, ou geração de peróxido de hidrogênio, se o substrato L-arginina está deficiente⁷. Portanto, a habilidade da eNOS de regular o fenótipo endotelial quiescente ou o ativado coloca essa enzima num papel central na homeostase endotelial.

Se a ativação endotelial e a sinalização redox são parte da defesa normal do hospedeiro, é de suma importância considerar quais as circunstâncias em que esses mecanismos podem contribuir para aterogênese e eventos clínicos. A diferença entre a defesa normal do hospedeiro e ativação celular danosa pode ser uma consequência da natureza, extensão, duração e combinação de estímulos pró-inflamatórios⁴. Por exemplo, foi demonstrada recentemente uma redução profunda, porém transitória, da dilatação endotélio-dependente associada com infecções leves na infância⁸. Isso pode ser um mecanismo adaptativo, e não necessariamente pró-aterogênico, mas pode assim se tornar se as condições adversas ambientais estiverem presentes e forem de caráter mais persistente. Isso pode incluir fatores de risco como hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes, assim como outras condições inflamatórias conhecidas, como periodontite, que pode induzir a desregulação crônica do NO e a produção de ROS^{9,10}. Todos esses mecanismos desencadeados por fatores ambientais que levam à ativação endotelial são provavelmente modulados por fatores genéticos.

Em algumas circunstâncias, a produção crônica de ROS pode exceder a capacidade celular enzimática e não enzimática de produção de antioxidantes e, portanto, contribuir para a doença vascular por indução de ativação endotelial sustentada. Uma importante fonte de ROS é provavelmente mitocondrial, visto que a produção de ROS e a capacidade da superóxido dismutase mitocondrial estão habitualmente balanceadas durante a fosforilação oxidativa¹¹. Isso pode sofrer distúrbios durante hipóxia ou condições em que haja aumento do substrato, tal como ocorre com transtornos metabólicos relacionados a obesidade ou diabetes tipo II, que são caracterizados por hiperglicemia e aumento dos ácidos graxos livres circulantes^{12,13}. Outras fontes importantes de estresse oxidativo no endotélio são as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases, assim como a xantina oxidase, as quais, com se observou, têm atividade aumentada em artérias de pacientes com doença coronariana^{14,15}. A sinalização endotelial de ROS pode ser desencadeada, ainda, pela exposição a citocinas inflamatórias e fatores de crescimento e pela interação do endotélio com leucócitos. Independentemente da sua fonte, a interação entre ROS e NO estabelece um círculo vicioso, que resulta em ativação endotelial subsequente e inflamação.

LESÃO E REPARO ENDOTELIAL

A exposição prolongada ou repetida a fatores de risco cardiovascular pode exaurir o efeito protetor dos sistemas anti-inflamatórios entre as células endoteliais. Como consequência, não apenas o endotélio se torna disfuncional, mas também as células endoteliais podem perder sua integridade, podendo progredir para a senescência e se destacar para a circulação¹⁶. Os marcadores circulantes de tal dano celular endotelial incluem micropartículas endoteliais derivadas de células ativadas ou apoptóticas e células endoteliais inteiras¹⁷. Observou-se o aumento desses marcadores tanto na doença aterosclerótica periférica e coronária como em outras condições inflamatórias associadas com aumento do risco vascular como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico¹⁸. Esses marcadores podem ser quantificados e se tornar candidatos promissores para a prática clínica (ver abaixo).

A integridade endotelial depende não apenas da extensão da injúria, mas também da capacidade endógena de reparação. Dois mecanismos pelos quais o reparo ocorre foram recentemente identificados. Células endoteliais maduras adjacentes podem se replicar localmente e substituir as células danificadas ou que foram perdidas. Mais recentemente, tem ficado claro que células progenitoras endoteliais circulantes são um mecanismo alternativo importante para manutenção e reparo do endotélio¹⁹. Essas células são recrutadas da medula óssea para a circulação periférica e podem se diferenciar em células maduras com características endoteliais. A mobilização dessas células é em parte NO-dependente e pode estar prejudicada em pacientes com fatores de risco cardiovascular²⁰. Da mesma maneira, fatores que demonstram levar à melhora da função endotelial e à biodisponibilidade de NO, como exercício e estatinas, também demonstraram ter um efeito positivo poderoso na mobilização das células progenitoras endoteliais²¹⁻²³.

AValiação CLÍNICA DA FUNÇÃO ENDOTELIAL

A melhor compreensão da biologia vascular do endotélio permitiu o desenvolvimento de testes clínicos que avaliam diversos aspectos das propriedades funcionais do endotélio normal e ativado²⁴. Idealmente, tais testes deveriam ser seguros, não invasivos, reprodutíveis, de baixo custo e padronizados entre os laboratórios. Os resultados também deveriam refletir a biologia dinâmica do endotélio por toda a história natural da doença aterosclerótica, definir os processos de doença subclínica, assim como providenciar informação prognóstica para estratificação de risco na fase clínica tardia. Nenhum teste atualmente preenche esses critérios, e uma grande variedade de testes é, portanto, necessária para caracterizar as múltiplas facetas da biologia endotelial⁴.

RESPOSTA VASOMOTORA ENDOTÉLIO-DEPENDENTE

A avaliação da resposta vascular endotélio-dependente tem sido ampla e clinicamente usada para o estudo da função endotelial. Os testes utilizam estímulos farmacológicos e/ou fisiológicos que promovem a liberação endotelial de NO e outros compostos vasoativos e, frequentemente, envolvem uma comparação com as respostas vasculares a dilatadores endotélio-independentes como a nitroglicerina. A determinação da biodisponibilidade local de NO não reflete apenas sua influência no tônus vascular, mas também outras funções importantes dessa molécula, que incluem tromborregulação, adesão e proliferação celular⁴.

Os estudos iniciais da função endotelial foram realizados na circulação coronariana e envolviam a infusão local de acetilcolina e a medida da mudança no diâmetro do vaso por meio da angiografia coronariana quantitativa^{25,26}. A acetilcolina libera NO dos vasos com endotélio intacto, o que leva à vasodilatação, mas causa vasoconstrição em sujeitos com disfunção endotelial, como resultado de um efeito vasoconstritor muscarínico direto na célula muscular lisa.

Respostas a uma grande variedade de agonistas endoteliais, que incluem a substância P, adenosina e bradicinina, também têm sido utilizadas, assim como estímulos fisiológicos, como o teste *cold-pressor* e a dilatação mediada por fluxo (FMD) de artérias de condutância proximais²⁷. Além disso, o uso de antagonistas específicos do NO como o L-NMMA definiu a contribuição do NO a essas respostas vasomotoras²⁸. Esses estudos providenciaram descobertas importantes sobre os efeitos vasculares dos fatores de risco e a potencial reversibilidade da disfunção endotelial em resposta a intervenções como as estatinas e aos inibidores da enzima de conversão de angiotensina^{29,30}.

Embora esses testes acessem diretamente a circulação coronariana, sua natureza invasiva limita seu uso para pacientes com doença avançada e exclui a repetição seriada dos testes para acompanhamento. Como a disfunção endotelial é um processo sistêmico, uma abordagem menos invasiva foi desenvolvida utilizando os mesmos princípios de infusão local de *probes* farmacológicos e medidas das alterações do tônus vascular do antebraço pela pletismografia de oclusão venosa³¹. Isso providenciou uma oportunidade de avaliação da fisiopatologia endotelial durante o estágio pré-clínico de doença por meio do uso de agonistas e antagonistas apropriados, possibilitando a construção de curvas dose-resposta. A correlação entre as respostas à acetilcolina na circulação coronária e no antebraço foi bem demonstrada. A pletismografia de oclusão venosa tem sido amplamente utilizada, principalmente utilizando a infusão de substâncias diretamente na artéria braquial. Nesses casos, por necessitar para sua execução de canulação arterial, isso limita seu uso repetido e o torna um método invasivo e proibitivo em grandes estudos. Os resultados também são de difícil padronização, em virtude de o tônus basal do vaso de

resistência ser variável e os protocolos de teste diferirem entre os laboratórios de pesquisa. A relevância clínica em relação à aterosclerose também é incerta, por causa de a fisiopatologia microvascular não necessariamente refletir as mudanças nas artérias de condutância, as quais são particularmente predispostas a desenvolver a doença⁴.

Por todas essas razões, buscou-se o desenvolvimento de outros métodos. Em 1992, foi descrito um teste não invasivo utilizando ultrassom para acessar a função vascular de uma artéria de condutância na circulação sistêmica³². Nesse método, o diâmetro da artéria braquial é medido antes e depois de um aumento do *shear stress*, que é induzido por hiperemia reativa (FMD). Quando um *cuff* de esfigmomanômetro colocado no antebraço é insuflado e liberado 4 a 5 minutos após, a FMD ocorre predominantemente como um resultado da liberação endotelial de NO³³.

Assim como na circulação coronariana, essa resposta da artéria braquial pode ser contrastada com a resposta a um vasodilatador endotélio-independente como a nitroglicerina sublingual³². Apesar de tecnicamente trabalhoso, esse método pode ser padronizado, a fim de produzir resultados reprodutíveis que apresentam correlação com a função endotelial vascular coronariana^{34,35}. O desenvolvimento de *softwares* modernos permitiu a avaliação contínua do diâmetro arterial e do fluxo sanguíneo por meio de todo protocolo, pelo uso de algoritmos de detecção que podem ser editados manualmente. É importante notar que variações nessa técnica, como a posição de oclusão do *cuff* e a duração da insuflação, podem produzir resultados que são menos representativos da atividade local de NO. Apesar disso, esse método trouxe inúmeras vantagens para a área da pesquisa. A FMD da artéria braquial tem sido estudada amplamente em pesquisa clínica, por permitir a avaliação seriada de indivíduos jovens, incluindo crianças. Também permite testar intervenções farmacológicas ou de estilo de vida na biologia endotelial em um estágio precoce pré-clínico, quando o processo de doença tem mais probabilidade de ser reversível³⁶. Esse teste representa o *gold standard* para pesquisa clínica da biologia endotelial em vasos arteriais de condutância e sua introdução foi responsável por abrir um novo campo na área de epidemiologia vascular. Existem, porém, desafios práticos que precisam ser superados antes que essa técnica possa ser adequada para o uso na prática clínica de rotina³⁴. Esses desafios incluem a necessidade de operadores altamente treinados, o custo do equipamento e também o cuidado necessário para minimizar as influências fisiológicas e ambientais, como exercício, dieta, ingestão de cafeína e variações na temperatura.

MARCADORES CIRCULANTES DA FUNÇÃO ENDOTELIAL

Uma avaliação ampla das numerosas funções do endotélio pode ser obtida pelo estudo dos níveis de moléculas de origem endo-

telial na circulação periférica. Essas incluem produtos diretos das células endoteliais que sofrem mudanças quando o endotélio está ativado, tais como medidas da biologia do NO, citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, reguladores de trombose, assim como marcadores de dano ou reparo endotelial. Muitos desses marcadores circulantes são de medição difícil e de alto custo e são habitualmente apenas utilizados em ambiente de pesquisa clínica³⁷.

Níveis circulantes de nitritos e proteínas nitrosiladas refletem, em parte, a geração endotelial de NO, mas são difíceis de medir e podem nem sempre representar a produção endotelial de NO³⁸. Especificamente, os valores podem se confundir com outras espécies que contêm nitrogênio, outras fontes de NO e uma ampla variação de NO proveniente da dieta. A dimetilarginina assimétrica é um derivado endógeno, antagonista competitivo da NO sintase. Os seus níveis estão elevados em sujeitos com fatores de risco, como dislipidemia e hipertensão, assim como em pacientes com doenças associadas com aterosclerose, como diabetes e insuficiência renal. Elevações dos níveis da dimetilarginina assimétrica estão associadas com redução da biodisponibilidade de NO em estudos animais e clínicos³⁹. Sua medida pode vir a se tornar um marcador de risco na prática clínica⁴⁰, porém, até o momento, os ensaios permanecem de alto custo e dificuldade.

A ativação endotelial leva à expressão aumentada de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão que têm papel importante na iniciação, progressão e desestabilização da lesão aterosclerótica. Moléculas bem caracterizadas que podem ser medidas na circulação com imunoenaios comerciais incluem a E-selectina e a P-selectina, entre outras^{41,42}. A E-selectina é provavelmente a mais específica para ativação endotelial. Seus níveis aumentam em associação com fatores de risco cardiovascular e foram associados com medidas funcionais e estruturais da doença aterosclerótica, assim como com prognóstico cardiovascular adverso^{43,44}.

Similarmente, as consequências procoagulantes da ativação endotelial podem ser medidas como alterações no balanço do ativador do plasminogênio tecidual e seu inibidor endógeno, o inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1)⁴⁵. Além disso, o fator de Von Willebrand, uma glicoproteína amplamente derivada do endotélio, é liberado para a circulação por células endoteliais ativadas. Esse agente apresenta função tanto na ativação celular posterior quanto na promoção da ativação plaquetária e da coagulação e pode ser facilmente medido^{46,47}.

A compreensão de que a função endotelial reflete o resultado do balanço entre injúria e reparo levou ao desenvolvimento de ensaios para quantificar o desprendimento de células endoteliais maduras e micropartículas derivadas para representar os diversos graus de lesão, assim como a determinação do número e características funcionais das células endoteliais progenitoras circulantes, refletindo, assim, o potencial endógeno de reparo⁴.

Células endoteliais circulantes que se desprendem no contexto de ativação endotelial e perda da integridade podem ser mensuradas na circulação tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia fluorescente⁴⁸. O aumento dos níveis de células endoteliais circulantes em pacientes com doença aterosclerótica e inflamação vascular sugere uma relação direta entre o número dessas células na circulação periférica e a extensão da injúria endotelial⁴⁹.

Apesar da demonstração de que a mensuração de células endoteliais circulantes e de células endoteliais progenitoras está correlacionada a outras medidas da função endotelial *in vivo* e à ocorrência de eventos cardiovasculares futuros⁵⁰, essas novas medidas ainda estão longe do uso clínico. Todavia, é provável que novas descobertas na evolução da doença e potenciais oportunidades de tratamento emergirão desse campo, que rapidamente se desenvolve.

APLICAÇÕES CLÍNICAS

As evidências atuais sugerem que a função endotelial é um marcador integrativo dos efeitos resultantes da presença de fatores de risco tradicionais e emergentes na parede arterial e de sua capacidade de reparo intrínseco. Essa biologia vascular endotélio-dependente é crítica não apenas na iniciação e na progressão da aterosclerose, mas também na transição da doença estável para o estado instável. Como resultado, o estudo da função endotelial em pesquisa clínica tem emergido como um *end point* importante que complementa a dosagem de fatores de risco circulantes, técnicas de imagem para detecção do surgimento de doenças arteriais estruturais (como espessamento da camada média íntima da carótida), ultrassom intravascular e tomografia computadorizada, além de resultados clínicos cardiovasculares tradicionais.

Em pacientes com aterosclerose estabelecida, distúrbios na resposta vasomotora associados com ativação endotelial podem contribuir para isquemia miocárdica transitória e *angina pectoris*⁵¹, além de estar associados a alterações da composição e biologia da placa, o que pode influenciar sua estabilidade⁵². Deve-se reconhecer que a função endotelial, ao contrário das medidas da morfologia da parede do vaso, apresenta variabilidade biológica intrínseca; assim, uma medida isolada, de maneira semelhante à medida da pressão arterial, pode dar apenas uma informação de caráter instantâneo e limitada em alguns casos. Todavia, muitos estudos clínicos de coorte têm demonstrado que uma medida isolada da função endotelial tanto na circulação coronariana quanto na circulação periférica apresenta valor prognóstico tanto em pacientes com doença coronariana estabelecida quanto em sujeitos com sintomas atípicos^{53,54}.

Algumas questões, porém, requerem investigação adicional em grandes estudos prospectivos. Estas incluem o valor preditivo adicional dessa abordagem em relação a outros marcadores

de risco estabelecidos, a aplicabilidade na população geral e qual o perfil de teste mais apropriado, o que pode incluir uma combinação de testes para marcadores endoteliais circulantes e respostas vasomotoras⁴. O principal valor, porém, do estudo da função endotelial é que sua avaliação pode indicar uma série de intervenções numa fase mais precoce do curso da doença, em que a resposta ao tratamento pode ser mais eficaz. Na doença avançada, uma verdadeira “caixa de Pandora” já foi aberta, e o resultado pode depender de muitos fatores, e nem todos podem ser identificados e modificados. Há uma necessidade clara para novas estratégias de testes clínicos que possam refinar a avaliação de risco cardiovascular individualmente e, em particular, identificar aqueles pacientes de maior risco e sua resposta ao tratamento⁵⁵. Apesar da avaliação de a função endotelial ter acrescentado muito na compreensão do processo aterosclerótico, ainda não é adequada para *screening* ou para decisão clínica individual, visto que os testes ainda são de difícil execução e de alto custo e apresentam certa variabilidade que ainda limita seu uso para rotina clínica⁵⁶.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Apesar de ainda não estar disponível para o uso na rotina de avaliação clínica, a habilidade de medir a função endotelial de maneira não invasiva já levou a mudanças na compreensão da evolução da aterosclerose e na avaliação do impacto dos fatores de risco cardiovasculares na fisiologia do vaso na fase pré-clínica da doença, além de possibilitar o estudo dos resultados de intervenções terapêuticas, que não são possíveis com os exames comuns padronizados no momento para esse fim.

Uma abordagem abrangente que envolva a mensuração da função endotelial, da predisposição genética, de fatores de risco e da doença estrutural arterial provavelmente será a melhor forma de avaliar novas estratégias terapêuticas, particularmente na fase precoce e pré-clínica da doença, estágio durante o qual um melhor manejo pode resultar em maiores benefícios em saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:1928-9.
2. Vita JA, Keaney JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation*. 2002;106:640-2.
3. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-9.
4. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:1285-95.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
6. Rhee SG. Cell signaling: H2O2, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312:1882-3.
7. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-14.
8. Charakida M, Donald A, Terese M, Leary S, Halcox JP, Ness A, et al.; ALS-PAC Study Team. Endothelial dysfunction in childhood infection. *Circulation*. 2005;111:1160-5.

9. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1468-74.
10. D'Auto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. *Am Heart J.* 2006;151:977-84.
11. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995;11:376-81.
12. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813-20.
13. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23:599-622.
14. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494-501.
15. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation.* 2003;107:1383-9.
16. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1728-30.
17. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000;101:841-3.
18. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombotic propensity. *Blood.* 2004;103:3677-83.
19. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7.
20. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370-6.
21. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004;20:109:220-6.
22. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-90.
23. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105:3017-24.
24. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al.; Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part I. Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2005;23:7-17.
25. Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation.* 1989;80:458-65.
26. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986;315:1046-51.
27. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16:349-56.
28. Goodhart DM, Anderson TJ. Role of nitric oxide in coronary arterial vasomotion and the influence of coronary atherosclerosis and its risks. *Am J Cardiol.* 1998;82:1034-9.
29. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease: the TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) study. *Circulation.* 1996;94:258-65.
30. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med.* 1995;332:488-93.
31. Joannides R, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function: a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006;20:311-20.
32. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340:1111-5.
33. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91:1314-9.
34. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al.; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-65.
35. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé DP, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:1235-41.
36. Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, et al. Effects of diet and exercise on obesity related vascular dysfunction in children. *Circulation.* 2004;109:1981-6.
37. Smith Jr Sr, Anderson JL, Cannon 3rd Rd, Fadl YY, Koenig W, Libby P, et al. CDC/ AHA. CDC/ AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the clinical practice discussion group. *Circulation.* 2004;110:e550-3.
38. Rassaf T, Feelisch M, Kelm M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:413-22.
39. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1023-30.
40. Boger RH, Maas R, Schulze F, Schwedhelm E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:1124-9.
41. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation.* 2004;109:IV6-V19.
42. Rifai N, Ridker PM. Inflammatory markers and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:383-9.
43. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1997;16:96:4219-25.
44. 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;10:351:88-92.
45. Vaughan DE. PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1878-83.
46. Meyer AA, Kundt G, Steiner M, Schuff-Werner P, Kienast W. Impaired flow-mediated vasodilation, carotid artery intima-media thickening, and elevated endothelial plasma markers in obese children: the impact of cardiovascular risk factors. *Pediatrics.* 2006;117:1560-7.
47. Mannucci PM. Von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1359-62.
48. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux DJ, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost.* 1992;67:147-53.
49. Goon PK, Boos CJ, Lip GY. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction. *Clin Lab.* 2005;51:531-8.
50. Werner N, Nickenig G. Clinical and therapeutic implications of EPC biology in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* 2006;10:318-32.
51. van Boven AJ, Jukema JW, Zwiderman AH, Crijns HJ, Lie KI, Brusckhe AV. Reduction of transient myocardial ischemia with pravastatin in addition to the conventional treatment in patients with angina pectoris. REGRESS Study Group. *Circulation.* 1996;94:1503-5.
52. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-33.
53. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes Jr Dr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000;101:948-54.
54. Halcox JPU, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002;106:653-8.
55. Witte DR, Westerink J, Koning EJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Bots ML. Is the association between flow-mediated dilation and cardiovascular risk limited to low-risk populations? *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1987-93.
56. Tardif JC, Heononen T, Orloff D, Libby P. Vascular biomarkers and surrogates in cardiovascular disease. *Circulation.* 2006;113:2936-42.