

Endotélio e aterosclerose

Luciana Bahia¹, Luis Guilherme Kraemer Aguiar¹, Nivaldo Ribeiro Villela², Daniel Bottino³, Eliete Bouskela⁴

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Palavras-chave: Endotélio, Aterosclerose, Inflamação, Estresse oxidativo

Resumo

A aterosclerose é uma doença oriunda da disfunção endotelial e de inflamação. O endotélio vascular regula a homeostase vascular, provocando alterações funcionais adaptativas através da liberação de várias substâncias com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover a adesão de moléculas, e com ações vasoativas. A homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções. O óxido nítrico (ON) é a principal substância antiaterogênica. A perda da atividade biológica do ON, denominada de disfunção endotelial, pode ser o evento desencadeante da doença aterosclerótica vascular em humanos. A disfunção endotelial ocorre bem antes das manifestações estruturais da aterosclerose e a sua avaliação clínica pode servir como preditor futuro de eventos cardiovasculares, sendo um marcador da atividade da doença aterosclerótica. O objetivo dessa revisão é abordar os mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose, os métodos de avaliação da função endotelial em humanos e a sua aplicabilidade clínica.

Introdução

A doença cardiovascular aterosclerótica é responsável por mais de 19 milhões de mortes anuais¹. A descrição feita por Furchgott e Zawadzki², em 1980, do fator de relaxamento dependente do

endotélio (EDRF), posteriormente identificado como o óxido nítrico^{3,4}, desencadeou uma série de estudos sobre o endotélio e a sua importância em várias condições clínicas, incluindo a aterosclerose⁵.

Em condições fisiológicas, o endotélio contribui com a homeostase vascular por promover alterações funcionais adaptativas. O endotélio libera várias substâncias autócrinas e parácrinas com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover adesão celular e com ações vasoativas (Quadro 1). A homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções⁶. O óxido nítrico (NO) é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase (NOs)^{4,5}. Além da sua ação vasodilatadora, o NO inibe a adesão e a agregação plaquetárias⁷, impede a proliferação do músculo liso vascular⁸, limita o recrutamento vascular de leucócitos⁷ e inibe a produção do fator tecidual⁹ que é um determinante crítico na geração do trombo. Enquanto o NO é a principal substância vasodilatadora liberada pelo endotélio, a endotelina 1 (ET1) age contrariamente ao NO, tendo um efeito vasoconstritor, além de aumentar a atividade central e periférica do sistema nervoso simpático, de possuir ação natriurética e de estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona¹⁰.

Na presença de fatores inflamatórios e dos fatores de risco cardiovascular mais frequentes há perda da ação protetora do endotélio, com aumento da propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede do vaso¹¹. Assim, a perda da atividade biológica do NO, denominada

¹ Mestres em Endocrinologia pela UERJ, Doutorandos em Ciências Biológicas pelo IBRAG

² Mestre e Doutor em Anestesiologia pela UNESP

³ Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia da UERJ

⁴ Professor Titular do Departamento de Fisiologia Cardiovascular da UERJ

Quadro 1
Substâncias derivadas do endotélio

Manutenção do tônus vascular	Balço entre fluidez e trombose	Controle do processo inflamatório	Fatores de crescimento
Óxido nítrico	Óxido nítrico	Fator quimiotático de monócitos (MCP-1)	Fator de crescimento derivado do endotélio
Prostaglandinas (PGI ₂ , TxA ₂)	Ativador plasminogênio tissular	Moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1,	Fator de crescimento derivado das plaquetas selectinas)
Endotelina 1	PAI -1	Interleucinas 1, 6 e 18	Fator estimulador de colônia-M
Angiotensina II	Fator Von Willebrand	Fator de necrose	tumoral
Peptídeo natriurético tipo C	Trombomodulina Prostaglandinas Fator tissular		

de disfunção endotelial, pode ser o evento desencadeante da doença aterosclerótica vascular em humanos⁵ e, a sua avaliação, um marcador precoce de risco de aterosclerose.

Estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial

A geração de radicais livres é o processo final de lesão celular da maioria dos fatores de risco cardiovascular, sendo denominado ESTRESSE OXIDATIVO¹². Este processo se origina na secreção de NO, um produto gasoso instável e altamente difusível, que é um intermediário químico capaz de exercer efeitos na transdução de sinais biológicos específicos de maneira autócrina (na própria célula de origem) ou parácrina (em células contíguas). A óxido-nítrico-sintase (NOs) é a enzima responsável pela síntese de NO, tendo sido identificadas três isoformas distintas: NOs neuronal (tipo I), NOs indutível (tipo II) e NOs endotelial (tipo III)¹³. As isoformas de NOS catalisam a oxidação dos elétrons da L-arginina para NO e L-citrulina. A síntese de NO é influenciada por vários cofatores como tetrahydrobiopterina, inibidor da NOS endógena- dimetilarginina assimétrica (ADMA) e da disponibilidade do substrato¹⁴.

Existem outras moléculas ativas formadas a partir do NO e denominadas espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs). A produção de EROs é usualmente um processo enzimático, estimulado por agonistas específicos, cujos níveis estão anormais em condições patológicas. O radical

superóxido, uma das principais EROs de interesse biológico, reage de modo rápido e favorável com o NO, inibindo sua bioatividade e gerando espécies reativas oxidantes secundárias, como o peroxinitrito (ONOO⁻), um potente oxidante capaz de oxidar moléculas de LDL, causar disfunção vascular e nitrificar os resíduos de tirosina das proteínas¹².

O equilíbrio interativo entre estas moléculas é determinante da função celular, por meio de regulação de proteínas específicas e lipídeos. Desta forma, a disfunção endotelial decorrente da ação dos radicais livres pode ser resumida como uma disfunção da sinalização redox vascular, ou seja, uma transdução de sinais celulares mediada por reações de transferência de elétrons, envolvendo radicais livres (intermediários dotados de existência independente e que apresentam um elétron desemparelhado na última camada).

A produção excessiva de EROs ou uma diminuição das defesas antioxidantes leva à toxicidade celular por dois mecanismos¹²:

- desequilíbrio na sinalização das células vasculares, com as EROs agindo como segundo mensageiro intracelular;
- toxicidade química direta das EROs pela alta reatividade destas espécies contra todos os componentes químicos celulares, que pode danificar o DNA e levar à apoptose.

Uma das principais vias finais do estresse oxidativo é a perda da bioatividade do NO, com conseqüente redução da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio¹⁵. Este processo é apenas um dentre as várias manifestações do complexo desequilíbrio

redox e dos múltiplos déficits funcionais associados à disfunção endotelial.

O endotélio apresenta papel fundamental no início e na perpetuação do processo inflamatório crônico vascular, principalmente através de sua capacidade de secretar citocinas e moléculas de adesão. O endotélio normal não permite a aderência de leucócitos, porém, nas fases precoces da aterosclerose, as células endoteliais expressam moléculas de adesão, em função de estímulos como IL-1, TNFa, PCR, com recrutamento de células inflamatórias, posterior migração transendotelial e penetração na íntima do vaso¹⁶. A liberação contínua de citocinas pelo endotélio e pelas células espumosas perpetuam o processo inflamatório, o acúmulo de lipídeos e influenciam a atividade das células musculares lisas.

As moléculas de adesão mais estudadas são: selectinas (P, E e L), moléculas de adesão intercelular (ICAMs) e moléculas de adesão das células vasculares (VCAM-1). Suas formas solúveis têm sido identificadas na circulação e servem como marcador de risco para eventos cardiovasculares¹⁷.

Avaliação da função endotelial

A avaliação da função endotelial é importante para o entendimento da etiopatogenia da aterosclerose e avaliação dos resultados de intervenções preventivas e terapêuticas.

A avaliação da resposta vasodilatadora dependente do endotélio é um indicador da saúde do endotélio. A avaliação das mudanças do fluxo sanguíneo, após hiperemia reativa ou injeção intra-arterial (coronária ou periférica – braquial ou femoral) de substâncias vasoativas, pode ser analisada através de vários métodos. A administração de acetilcolina (Ach) acarreta uma resposta vasodilatadora dependente da liberação endotelial de NO. Esta liberação basal pode ser avaliada através do uso de inibidores específicos das NOs, como monometil-L-arginina (L-NMMA). A administração de nitroprussiato de sódio ou nitratos acarreta uma resposta vasodilatadora independente do endotélio, ou seja, por ação direta sobre as células musculares lisas.

Os estudos iniciais para a análise da vasodilatação endotélio-dependente em artérias coronárias foram realizados por angiografia coronária após a infusão de acetilcolina¹⁸ e aumento de fluxo sanguíneo¹⁹. Demonstrou-se que indivíduos com comprovada doença aterosclerótica coronariana apresentavam diminuição da vasodilatação mediada pelo aumento do fluxo e vasoconstrição paradoxal após infusão

de acetilcolina¹⁸. Posteriormente foi demonstrado que essa resposta vasoconstritora coronária ocorreu por um aumento da liberação de endotelina 1 (ET1)²⁰. Os testes não-invasivos para a avaliação da função endotelial coronariana incluem o ecocardiograma com Doppler, a tomografia com emissão de pósitrons (PET) e a ressonância nuclear magnética com contraste.

O estudo da circulação sanguínea dos membros pode ser feito através da infusão intra-arterial (braquial ou femoral) de agentes vasoativos e medidos através de pletismografia de oclusão venosa. Este método tem sido utilizado há quase 100 anos²¹ e, anterior à descoberta do endotélio, era utilizado para estudar o papel do sistema nervoso autônomo na regulação do fluxo sanguíneo dos membros. Ainda hoje permanece como poderosa ferramenta de avaliação das respostas do fluxo a numerosos estímulos (exercícios, estresse mental, isquemia, aquecimento) e permite o uso de várias substâncias agonistas e antagonistas em um leito vascular mais acessível. Esta técnica utiliza um sensor que mede as mudanças no volume do antebraço decorrente do aumento do fluxo sanguíneo. Sua limitação se deve à necessidade de cateterização arterial e por isso, aplicação limitada em estudos de larga escala.

O estudo da vasodilatação mediada pelo fluxo é um bom indicador da função endotelial, podendo ser realizado de maneira não-invasiva através do uso do doppler vascular. A resposta ao aumento do fluxo após um período de isquemia é, em grande parte, dependente da liberação de NO, mas também reflete a liberação de outras substâncias vasodilatadoras²². Esta técnica pode ser aplicada a grandes estudos populacionais e realizada várias vezes ao longo do tempo, mas é dependente da habilidade e da prática do observador²³.

Schroeder et al. demonstraram, em estudo piloto, que a presença de disfunção endotelial pela análise do fluxo após hiperemia reativa se correlacionou com a presença de doença coronariana, em 122 pacientes submetidos à angiografia coronariana, com sensibilidade de 71% e especificidade de 81%, sugerindo que este método não-invasivo pode ser mais um teste de *screening* para o diagnóstico precoce da doença aterosclerótica coronariana, sendo necessários, no entanto, estudos prospectivos²⁴. A circulação braquial está diminuída em indivíduos com vários fatores de risco cardiovascular e responde a intervenções que diminuam este riscos^{25,26}.

Zeiber et al. sugeriram que a vasodilatação mediada pelos receptores de acetilcolina se encontra

diminuída em estágios precoces da doença aterosclerótica, enquanto a dilatação dependente do fluxo se encontra alterada em estágios mais avançados da doença²⁷. Assim, os testes com infusão de agonistas da acetilcolina seriam os mais indicados para a avaliação precoce da disfunção endotelial, principalmente na circulação coronariana, embora a acetilcolina possa ter efeito paradoxal direto sobre as células musculares lisas¹⁸.

A medida da rigidez arterial, que inclui a velocidade da onda de pulso e a distensibilidade arterial, tem sido realizada através da tonometria e utilizada como método não-invasivo para a avaliação da saúde vascular²⁸. Já são encontrados estudos recentes demonstrando que este método prediz eventos cardiovasculares^{29,30}. A rigidez arterial é altamente dependente das alterações estruturais fixas da parede arterial, como o grau de fibrose e calcificação²⁸. Assim, a confirmação da relação precisa entre a disfunção endotelial e a rigidez arterial necessita de mais estudos.

Podem ser utilizadas as dosagens de substâncias circulantes secretadas pelo endotélio, embora existam dificuldades técnicas para as dosagens de NO e EROs por serem moléculas evanescentes (meia-vida curta). A dosagem da relação nitrito/nitrato, L-arginina, L-citrulina e ADMA podem servir como índices indiretos da disponibilidade de NO^{14,31}. As dosagens de fibrinogênio, fator de Von Willebrand, PAI-1, endotelina 1, moléculas de adesão e proteína C-reativa ultra-sensível podem ser utilizadas como marcadores indiretos da ativação endotelial¹⁶.

Ainda não existe um padrão-ouro para a medida do estresse oxidativo em humanos. A nitrotirosina é o produto final estável da produção de peroxinitrito e o ensaio de sua detecção em proteínas tem sido proposto como marcador indireto da produção de peroxinitrito. Em indivíduos normais geralmente os níveis de nitrotirosina são indetectáveis, e aumentados em condições de estresse oxidativo como hipertensão arterial³², choque séptico³³ e diabetes mellitus³⁴. Recentemente a mensuração dos isoprostanos plasmáticos ou urinários, que são moléculas semelhantes às prostaglandinas produzidas pela peroxidação do ácido araquidônico das membranas celulares e catalisada pelos radicais livres, tem sido estudada como reflexo da oxidação das moléculas de LDL *in vivo*³⁵. A medida do 8-epi-PGF2a, um dos isoprostanos mais abundantes, representa um marcador sensível e reprodutível do estresse oxidativo³⁵. A concentração plasmática ou urinária de isoprostanos está aumentada em várias

condições, tais como: doenças inflamatórias³⁵, diabetes mellitus³⁶, infarto do miocárdio/pós-angioplastia^{37,38} e hipercolesterolemia³⁹.

Aplicação clínica da avaliação da função endotelial

A disfunção endotelial é um evento precoce na doença vascular, ocorrendo antes que se possa detectar qualquer alteração morfológica do vaso. Além do seu significado precoce na aterosclerose, a disfunção endotelial também está presente nos estados mais avançados da doença, quando já são observadas manifestações clínicas²⁵. Alguns autores relataram redução importante da função endotelial em artérias coronárias com lesões ateroscleróticas responsáveis pelo aparecimento de angina instável ou infarto do miocárdio^{39,40}. A disfunção endotelial também promove resposta vasoconstritora anormal em situações desencadeadoras de eventos isquêmicos, como estresse físico e mental⁴¹.

A relação entre disfunção endotelial e doença vascular aterosclerótica tem sido confirmada por trabalhos clínicos que mostram um valor de predição da disfunção endotelial e progressão da doença aterosclerótica, independentemente dos fatores de risco cardiovasculares mais frequentes. Suwaidi et al.⁴² observaram, durante um período de 2,3 anos, 157 pacientes com doença aterosclerótica coronariana, classificados como portadores de função endotelial normal (n=83), disfunção endotelial moderada (n=32) e disfunção endotelial grave (n=42). A função endotelial foi avaliada por meio de injeção intracoronariana de acetilcolina, e a alteração do fluxo coronariano foi quantificada por Doppler. Houve uma incidência de 14% de eventos cardiovasculares (infarto do miocárdio, revascularização do miocárdio ou morte) no grupo com disfunção endotelial grave, considerado como tendo uma variação menor que 1% do fluxo sanguíneo coronariano, enquanto não houve qualquer evento nos grupos com função endotelial normal ou disfunção leve (variação do fluxo coronariano entre 0 e 50 %).

Schächinger et al.²⁶ também estudaram a resposta vasomotora coronariana em resposta à injeção de acetilcolina e nitroglicerina, à ativação do sistema nervoso simpático por imersão da mão do paciente em água gelada por 90 segundos (*cold pressor test*) e após a injeção de papaverina e adenosina para avaliar a dilatação dependente do fluxo, em 147 pacientes com doença coronariana. Estes autores acompanharam esses pacientes por um período de 7,7 anos e relataram

um aumento significativo na incidência de eventos cardiovasculares (morte, angina instável, infarto do miocárdio, angioplastia coronariana, revascularização do miocárdio, acidente vascular encefálico isquêmico ou revascularização arterial periférica) nos pacientes que apresentaram disfunção endotelial. Esta disfunção foi caracterizada como uma resposta vasoconstritora à acetilcolina e ao *cold pressor test* e redução na resposta vasodilatadora secundária ao aumento do fluxo sanguíneo e à injeção de nitroglicerina intracoronariana.

Halcox et al.⁴³ avaliaram a função endotelial coronariana em 308 pacientes que foram submetidos ao cateterismo cardíaco. Esses pacientes foram acompanhados por um período de 46 meses, tendo ocorrido 35 eventos cardíacos graves nesse período. A disfunção endotelial foi um fator de predição independente para a ocorrência desses eventos, inclusive nos pacientes com cateterismo normal.

Schindler et al.⁴⁴, em um estudo prospectivo, avaliaram se pacientes com cateterismo normal e resposta coronariana anormal ao *cold pressor test* apresentavam maior risco de evento cardiovascular. Esses autores avaliaram 130 pacientes por um período médio de 45±9 meses e encontraram eventos cardiovasculares nos grupos com resposta anormal e nenhum evento nos pacientes com resposta normal. Infelizmente esses autores não utilizaram a injeção de acetilcolina intracoronariana como método para a avaliação da função endotelial, o que significou uma limitação do experimento.

Diante da dificuldade da avaliação da disfunção endotelial com injeção intracoronariana de acetilcolina, alguns autores avaliaram a disfunção endotelial na circulação braquial como fator de predição para doenças cardiovasculares. Neuteufl et al.⁴⁵ avaliaram a função endotelial por estudo com ultra-som da dilatação da artéria radial mediada por fluxo, em 73 pacientes com dor torácica. Esses pacientes foram acompanhados por um período de 5 anos e os autores observaram que a disfunção endotelial foi um fator de predição independente para eventos cardíacos.

Heitzer et al.⁴⁶ avaliaram a função endotelial por pletismografia com oclusão venosa do antebraço com injeção intra-arterial de acetilcolina e nitroprussiato de sódio, em 281 pacientes com doença coronariana documentada. Observaram que a diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina foi um fator de predição independente

para eventos cardiovasculares. Não houve associação com a resposta obtida com o nitroprussiato de sódio.

Perticone et al.⁴⁷ também observaram que a disfunção endotelial foi um importante fator de predição para eventos cardíacos, estudando 225 pacientes hipertensos acompanhados por um período médio de 31,5 meses. Já Gokce et al.⁴⁸, em um estudo prospectivo, demonstraram haver uma forte relação entre a redução da dilatação da artéria braquial mediada por fluxo e eventos cardiovasculares adversos no pós-operatório, estudando um grupo de 187 pacientes de alto risco cardiovascular submetidos à cirurgia vascular.

Além da disfunção endotelial ter um importante valor de predição para eventos cardiovasculares, amparada por vários trabalhos clínicos, Benzuly et al.⁴⁹, através de um modelo experimental de aterosclerose induzida por dieta, em macacos, demonstraram que a melhora da função endotelial precedia a melhora morfológica da doença vascular aterosclerótica, sugerindo um papel prognóstico ao estudo da função endotelial na avaliação de intervenções preventivas para a redução do risco cardiovascular. Esse papel prognóstico da avaliação da função endotelial também foi descrito por Modena et al.⁵⁰ que acompanharam 400 mulheres pós-menopausa, hipertensas, com disfunção endotelial, por um período de 67 meses e observaram maior incidência de complicações cardiovasculares nas pacientes que não apresentaram melhora da função endotelial após 6 meses de controle efetivo da hipertensão arterial.

Conclusões

A aterosclerose deixou de ser vista como uma doença de lipídeos para ser estudada como um processo dinâmico e progressivo oriundo da disfunção endotelial e de inflamação. O estudo da patogênese deste processo, entendendo os mecanismos celulares e moleculares, é fundamental para a elaboração de intervenções preventivas. As evidências científicas sugerem que a disfunção endotelial ocorre bem antes das manifestações clínicas das alterações vasculares estruturais, provocadas pela aterosclerose e que a avaliação clínica da disfunção endotelial pode servir como preditor de eventos cardiovasculares, sendo um marcador da atividade da doença aterosclerótica.

Referências bibliográficas

1. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells W, Litovsky S, Rumberger J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient. A call for new definitions and risk assessment strategies. Part I. *Circulation* 2003;108:1664-672.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-76.
3. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-26.
4. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987;61:P866-P879.
5. Ganz P, Vita JA. Testing vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 2003;108:2049-53.
6. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Sem Thromb Hemost* 2000;26:463-77.
7. Kimlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:383-89.
8. Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 67B-70B.
9. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation* 2000;101:2144-148.
10. Lüscher TF, Seo B, Bühler FR. Potential role of endothelin in hypertension. *Hypertension* 1993;21:752-57.
11. Gimbrone Jr MA. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75:67B-70B.
12. Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912-916.
13. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1015-28.
14. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 2002;17:251-55.
15. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H822-H827.
16. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida J, Anderson T, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation. Part I. *Circulation* 2003;108:1017-23.
17. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170:191-203.
18. Lundmer PL, Selwyn AP, Shook TL. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Eng J Med* 1986;315:1046-51.
19. Cox DA, Vita JA, Treasure CB. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilatation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989;80:458-65.
20. Lerman A, Holmes DR, Bell MR, Garrat KN, Nishimura RA, Burnett JC. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995;92:2426-431.
21. Brodie TG, Russell AE. On the determination of the rate of blood flow through an organ. *J Physiol* 1905;32:47-49.
22. Joannides R, Haefeli WE, Linder L. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 1995;91:1314-319.
23. Corretti MC, Andreson TJ, Benjamin EJ, Celerjamer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the braquial artery. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.
24. Schroeder S, Markus E, Runald O, Meisner C, Andreas B, Pfohl M, et al. Noninvasive determination of endothelial-mediated vasodilatation as a screening test for coronary artery disease: Pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography and myocardial perfusion imaging. *Am Heart J* 1999;138:731-39.
25. Vita JA, Keaney Jr JF. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-42.
26. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-906.
27. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans: progressive endothelial dysfunction with different stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1991;83:391-401.
28. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Vasc Biol* 2003;23:554-66.
29. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 2001;37:1236-241.
30. Grey E, Bratelli C, Glasser SP. Reduced small artery but not large artery elasticity is a independent risk marker for cardiovascular events. *Am J Hypertension* 2003;16:265-69.
31. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-33.

32. Moriel P, Sevanian A, Ajzen S, Zanella MT, Plavnik FL, Rubbo H, Abdalla DSP. Nitric oxide, cholesterol oxides and endothelium-dependent vasodilatation in plasma of patients with essential hypertension. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1301-309.
33. Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1173-185.
34. Hoeldtke RD. Nitrosative stress in early Type 1 diabetes. *Clin Auton Res* 2003;13:406-21.
35. Cracowski JL, Durnad T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends in Pharmacological Sciences* 2002;23:360-66.
36. Giovanni D, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Sanatrone S, et al. In vivo formation of 8-isoprostaglandin F2 alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99:224-29.
37. Iuliano L, Domenico P, Greco C, Mangieri E, Scibilia G, Fitzgerald GA, et al. Angioplasty increases coronary sinus F2-isoprostane formation: evidence for in vivo oxidative stress during PTCA. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:76-80.
38. Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, Ogawa H, Morikami Y, Obata K, Sakaino N. Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery: difference between the constrictor response of the infarct-related coronary artery and that of the noninfarct-related artery. *J Am Coll Cardiol* 1992;19(4):752-58.
39. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, et al. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3230-235.
40. Bogaty P, Hackett D, Davies G, Maseri A. Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 1994;90:5-11.
41. Yeung AC, Vekshtein VI, Krantz DS, Vita JA, Ryan Jr TJ, Ganz P, Selwyn AP. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 1991;325:1551-556.
42. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948-54.
43. Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002;106: 653-58.
44. Schindler TH, Hornig B, Buser PT, Olschewski M, Magosaki N, Pfisterer M, et al. Prognostic value of abnormal vasoreactivity of epicardial coronary arteries to sympathetic stimulation in patients with normal coronary angiograms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:495-501.
45. Neuteufl T, Heher T, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol* 2000;86:207-10.
46. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-678.
47. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-96.
48. Gokce N, Keaney JF, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function. A prospective study. *Circulation* 2002;105:1567-572.
49. Benzuly KH, Padgett RC, Kaul S, Piegors DJ, Armstrong ML, Heistad DD. Coronary arterial injury/ myocardial infarction: functional improvement precedes structural regression of atherosclerosis. *Circulation* 1994;89:1810-818.
50. Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:505-10.