

BIOMARCADORES DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: NOVAS FRONTEIRAS PARA A PREVENÇÃO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Abraão Telles Rocha;
Clara Machado Rodrigues;
Fernando Silva Santos;
Jaqueline Rossi Marim;
Lee Anderson Cruvinel Campos;
Marianne Basseto Braga Araujo;
Renard Fernandes Dias;
Valesca Antunes Marques;
Graziella Tarsitano Wiggert;
Marcus Vinicius Iglesias de Souza

Resumo A disfunção endotelial é um dos primeiros eventos patológicos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e tem sido amplamente estudada como um biomarcador precoce dessas condições. O endotélio desempenha um papel crucial na regulação do tônus vascular, inflamação, trombose e permeabilidade vascular. Sua função é mediada principalmente pelo óxido nítrico (NO), uma molécula vasodilatadora produzida pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A redução na biodisponibilidade de NO, associada ao aumento do estresse oxidativo e da inflamação, resulta em um endotélio disfuncional, contribuindo para a aterosclerose e outras complicações cardiovasculares. Diferentes métodos têm sido empregados para avaliar a função endotelial, incluindo biomarcadores séricos e celulares. Entre os biomarcadores séricos, destacam-se moléculas pró-inflamatórias, como a proteína C-reativa (PCR), citocinas inflamatórias e moléculas de adesão celular (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina), que indicam ativação endotelial e progressão da inflamação vascular. Biomarcadores celulares, como micropartículas endoteliais e células progenitoras endoteliais circulantes, refletem lesão endotelial e capacidade regenerativa do endotélio. Além disso, novos biomarcadores vêm sendo estudados para aprimorar a detecção precoce da disfunção endotelial e sua correlação com DCV. Entre eles, MMPs/TIMPs, ANGPT L2, endoglin e homocisteína que, apesar da necessidade de estudos avançados, proporcionam novas perspectivas para a predição e prevenção de eventos cardiovasculares. A avaliação desses biomarcadores permite a detecção precoce da disfunção endotelial, contribuindo para a estratificação do risco cardiovascular e a personalização das intervenções terapêuticas. Mudanças no estilo de vida, terapia com estatinas, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e agentes antioxidantes são estratégias que visam preservar a função endotelial e reduzir a incidência de eventos cardiovasculares. Portanto, a identificação e monitoramento contínuo desses biomarcadores representam ferramentas valiosas na prevenção e manejo das DCV.

Palavras-chave: Disfunção endotelial. Doenças cardiovasculares. Óxido nítrico. Aterosclerose. Biomarcadores.

1. INTRODUÇÃO

As características definidoras dos sistemas biológicos são um conjunto de órgãos funcionais e sistemas hemodinâmicos, que facilitam o funcionamento dos órgãos. Uma característica importante é a maneira como esses compartimentos são separados e, em sistemas de mamíferos, isso ocorre por meio do revestimento de células únicas dos vasos sanguíneos, conhecido como endotélio. Embora inicialmente reconhecido por sua função de barreira, a compreensão do papel do endotélio se expandiu muito nas últimas décadas¹.

Em sua manifestação original, o papel do endotélio foi determinado para facilitar o intercâmbio bilateral de materiais nutricionais e residuais entre o sangue e os tecidos e controlar a coagulação do sangue, prevenindo e restringindo a formação de coágulos à cura de tecidos lesionados. Nos tempos modernos, o endotélio foi reconhecido como fonte de uma variedade de mediadores biológicos importantes, alguns dos quais estão entre as descobertas mais relevantes na história da biologia².

Esses mediadores são vasoconstritores, vasodilatadores e reguladores de trombose e inflamação. Nos últimos anos, o interesse na inflamação em patologia e fisiopatologia aumentou de forma significativa e o endotélio foi identificado como um mediador chave na regulação da

inflamação. O papel do endotélio em doenças e seu potencial como alvo terapêutico é hoje de grande interesse, especialmente em doenças cardiovasculares e na metástase do câncer^{3,4}.

Lesão em células endoteliais ou perturbação da homeostase no endotélio é denominada disfunção endotelial – um termo originalmente relacionado à capacidade vasodilatadora reduzida, mas se expandiu com a evolução da compreensão do papel do endotélio na inflamação crônica de várias doenças⁵.

2. HISTÓRIA DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio e as células endoteliais têm sido a fonte de algumas das principais descobertas na biologia humana. O fenômeno da disfunção endotelial consta na literatura há pelo menos 25 anos. A disfunção endotelial (DE) pode ser definida de forma resumida como a propriedade vasoativa ou capacidade vasodilatadora reduzida e, mais amplamente, como quaisquer alterações que impactam a função homeostática vasoprotetora do endotélio. As células endoteliais foram descobertas como a fonte de peptídeos vasoconstritores de 21 aminoácidos, conhecidos como endotelinas, em 1987, por Masaki et al².

Outro fator contrastante é um vasodilatador, que resultou na descoberta do gás lipofílico dissolvido, óxido nítrico (NO), designado por muitos anos como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)⁶. A constatação de que o EDRF era um gás dissolvido e que poderia mediar uma via de sinalização tradicional – ativação da cinase GMP cíclica – foi um grande estímulo para a comunidade científica, pois muitos esperavam que o EDRF fosse um peptídeo. Furchgott, Ignarro e Murad receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, em 1998, pela descoberta do EDRF, sendo NO e suas propriedades de sinalização. O NO media a vasodilatação e inúmeras outras respostas bioquímicas e celulares que são protetoras do endotélio e dos tecidos subjacentes⁵.

3. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E DOENÇA CARDIOVASCULAR

Estudos clínicos acreditam que a disfunção endotelial (DE) leva à aterosclerose acelerada. Nesse caso, suas duas forças motrizes incluem o impacto na vaso-regulação e na inflamação crônica não resolvida. Em resposta à lesão vascular, uma infinidade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são liberadas. As cascatas inflamatórias são complexas, envolvendo moléculas e células pró e anti-inflamatórias⁷.

Uma área que demonstra muito bem o papel do endotélio é a da função e disfunção erétil, que geralmente precede a doença cardiovascular (DCV) e pode ser considerada como um marcador precoce de DCV clinicamente relevante. Possivelmente não seja intuitivo o fato de que o funcionamento adequado envolva vasodilatação em oposição à vasoconstrição. A vasodilatação leva ao aumento do fluxo sanguíneo e à resposta biológica necessária^{8,9}.

Portanto, a DE, que reduz a vasodilatação, inibe o processo da função erétil. Isso permite compreender se correlação da disfunção erétil com a doença arterial coronária (DAC), que atinge toda a árvore vascular. Porém, sua manifestação é variável, de acordo com os leitos vasculares e o perfil individual do paciente. Assim, a disfunção erétil é como um indicador de DCV e indica a necessidade de monitoramento e avaliação do estado dos leitos vasculares associados a doenças cardíacas, derrames e amputações de membros inferiores^{8,10}.

Um endotélio normal regula a quiescência biologicamente desejável da vasculatura e protege contra a aterosclerose. Os efeitos no endotélio podem ser uma área muito difícil de estudar *in vitro*, especialmente no contexto de pressão arterial ou inflamação. Dados *in vitro* surgem de estudos em células vasculares isoladas, no entanto, o impacto de outros fatores como NO, endotelina (ET)-1 e angiotensina (Ang)-II tem múltiplas ações na condução do desenvolvimento da aterosclerose. O papel do sistema imunológico e da inflamação é muito complexo envolvendo múltiplos mediadores bioquímicos e celulares e, embora o conhecimento sobre o sistema imunológico esteja evoluindo, mais insights são necessários antes que uma intervenção terapêutica possa ser descrita. Ensaios em humanos de estratégias anti-inflamatórias, como o uso de anticorpos anti-interleucina (IL)-1 β no ensaio CANTOS, mostraram resultados promissores, mas os dados iniciais surgem em pacientes de alto risco e DCV secundária, em vez dos alvos desejáveis, que ocorrem em pessoas mais jovens com aterosclerose precoce^{11,12}.

Os inibidores de SGLT2 (SGLT2i) bloqueiam a reabsorção renal de glicose e têm um efeito importante no aumento da excreção de glicose e na redução da hiperglicemia. Também reduzem eventos cardiovasculares e morte em ensaios clínicos¹³. Dados indicam que os SGLT2i exercem ações favoráveis no sistema cardiovascular, incluindo a prevenção de eventos cardiovasculares. Os efeitos favoráveis da empagliflozina e seus efeitos na DE foram avaliados

pelo índice de tonometria arterial periférica (RHI) de hiperemia reativa em um ensaio clínico multicêntrico duplo-cego em 16 centros e mais de 100 pacientes que receberam empagliflozina ou placebo por 24 semanas (ensaio EMBLEM). Não houve diferença no RHI em pacientes que receberam empagliflozina ou placebo¹⁴. Em estudos pré-clínicos, no entanto, a dapagliflozina melhorou a DE em um modelo de camundongos com diabetes tipo 2 e também alterou o microbioma intestinal, que é um determinante emergente da DE e da DCV que precisa ser acompanhado^{12,13}.

4. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL – ASPECTOS CLÍNICOS

A avaliação clínica da DE corresponde a duas expressões – regulação vasoativa prejudicada e inflamação e resposta trombótica⁵. Enquanto a DE é caracterizada patofisiologicamente por um estado protrombótico, proinflamatório e aterogênico, sua avaliação tem se concentrado, principalmente, na função vasodilatadora da artéria e na capacidade de regular o tônus, a resistência e o fluxo sanguíneo. As primeiras avaliações da função endotelial da artéria coronária em humanos basearam-se na infusão direta intracoronária de vasodilatadores dependentes do endotélio (como a acetilcolina), acompanhada por angiografia quantitativa da artéria coronária^{15,16}.

Este mesmo método é usado nas circulações periférica e coronária, sendo a hiperemia, ou a resposta de dilatação induzida pela infusão direta de acetilcolina, o critério ou medida padrão-ouro da função endotelial. No entanto, a natureza invasiva dessa abordagem, incluindo a necessidade de cateterização intra-arterial e supervisão médica, limita sua utilidade em pesquisas e cenários clínicos. Com isso, vários métodos não invasivos foram desenvolvidos, fazendo com que o estresse de cisalhamento da artéria seja manipulado para induzir um aumento no fluxo sanguíneo e/ou diâmetro da artéria – que é, pelo menos em parte, dependente do endotélio¹⁷.

A dilatação mediada por fluxo (FMD) da artéria braquial é um método usado em pesquisa clínica, introduzido como uma medida não invasiva da função endotelial, em 1992, por Celemejer et al¹⁸. Enquanto o paciente está descansado e deitado em posição supina, um manguito de pressão arterial no antebraço é inflado por 5 min e então liberado para induzir hiperemia reativa local e estresse de cisalhamento. A imagem de ultrassom é usada para medir o diâmetro da artéria braquial na linha de base e durante o período após a liberação do manguito, e a diferença entre essas medidas representa a FMD. Essa resposta de dilatação é atenuada quando o inibidor de NO L-NMMA é infundido localmente, o que fornece alguma confirmação da dependência de NO da FMD¹⁹.

Consistente com a noção de que a DE está envolvida no início da aterosclerose, a FMD prejudicada foi relatada como um biomarcador precoce do desenvolvimento da doença aterosclerótica e está associada à progressão do espessamento da carótida-intima²⁰. Além disso, a FMD é prejudicada em grupos de pacientes com alto risco de eventos cardiovasculares. Na verdade, a FMD está negativamente associada ao risco de eventos cardiovasculares e mortalidade naqueles com e sem DCV estabelecida. Quando a FMD é avaliada usando o método padronizado recomendado, um aumento de 1 ponto na FMD (por exemplo, dilatação de 5 a 6%) está associado a uma redução de 9% no risco futuro de eventos cardiovasculares^{21,22}.

Apesar de seu uso generalizado em pesquisa, a FMD não foi adotada como uma ferramenta de avaliação clínica. Isso provavelmente se deve aos requisitos técnicos da medição da FMD, incluindo acesso a dispositivos de ultrassom adequados e ultrassonografistas bem treinados, além do tempo e da experiência necessários para análise de imagem. Métodos alternativos mais adequados para cenários clínicos foram desenvolvidos e testados, incluindo hiperemia passiva de movimento das pernas, que também depende do uso de ultrassom, e hiperemia reativa, que pode ser medida nos membros ou dígitos usando pletismografia ou tonometria arterial²³.

O dispositivo Endo-PAT, por exemplo, fornece uma medida automatizada de hiperemia reativa nos dedos e é relatado como o único dispositivo aprovado pela FDA para a avaliação não invasiva da função endotelial. As medidas derivadas do Endo-PAT são modestamente correlacionadas com a FMD, e cada método difere em sua associação com fatores de risco. Isso reflete diferenças na vasculatura avaliada, onde a FMD é uma medida da função macrovascular e o Endo-PAT indica a função microvascular, assim como diferentes patologias²⁴.

Muitos fatores de risco tradicionais são responsáveis por apenas cerca de 50–60% dos eventos cardiovasculares. A adoção de qualquer medida da função endotelial na prática clínica tem o potencial de somar valor à classificação e ao prognóstico da doença. Para isso, é necessária uma compreensão da variância natural da função endotelial. Usando métodos de

avaliação padronizados, valores de referência específicos para idade e sexo para FMD da artéria braquial foram publicados, o que fornece uma referência normativa para pesquisas futuras e, potencialmente, para a prática clínica²⁵.

5. BIOMARCADORES COMO INDICADORES DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A aplicação de biomarcadores séricos para monitorar a função endotelial apresenta inúmeras vantagens, dada a relativa simplicidade dos procedimentos. Amostras de sangue venoso são usadas em laboratórios clínicos e podem ser uma maneira acessível de medir biomarcadores sistêmicos de doenças vasculares. O uso desses marcadores para avaliar o prognóstico e / ou diagnóstico de distúrbios vasculares está crescendo continuamente, devido à sua relevância clínica. A identificação de biomarcadores é fundamental para a mudança da medicina reativa para a medicina 3P no campo vascular, ajudando a obter um perfil individualizado do paciente e a melhorar os resultados individuais²⁶.

5.1 Biomarcadores séricos

A ativação endotelial é desencadeada por vários estímulos inflamatórios, como toxinas, marcadores inflamatórios como proteína C reativa, ligante CD40 (CD40L), interleucinas (como IL-1 β , IL-18), ligante CC-quimiocina 2 (CCL2), pentraxina-3 e sortilina. Além disso, a inflamação é uma característica essencial no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e suas complicações. A cascata inflamatória está presente na disfunção endotelial e em todo o processo de aterosclerose^{27,28}.

5.2 Moléculas de adesão celular

As células endoteliais regulam a permeabilidade e o transporte de moléculas entre o sangue e o espaço intersticial e controlam as vias de sinalização associadas à imunidade inata. Devido à inflamação, elas são ativadas e a expressão das moléculas de adesão aumenta. As moléculas de adesão celular são consideradas marcadores precoces de ativação endotelial e inflamação sistêmica²⁷.

CAMs solúveis – ou seja, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), E-selectinas e molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1) – regulam a transmigração de leucócitos. ICAM-1 e VCAM-1 pertencem à superfamília das imunoglobulinas e são ligantes para integrinas β em leucócitos e células mononucleares, respectivamente. ICAM-1 é altamente expresso em células endoteliais e macrófagos subendoteliais, enquanto VCAM-1 é predominante em células endoteliais e não está presente em endotélio saudável²⁹⁻³¹.

O ICAM-1 participa da adesão e transmigração de leucócitos na parede endotelial vascular e leva à ativação e inflamação das células endoteliais, etapas iniciais na iniciação e progressão da aterosclerose. A expressão de VCAM-1 resulta da ativação endotelial, pois aumenta o recrutamento local de monócitos e sua interação com células endoteliais durante as fases iniciais do processo aterosclerótico^{32,33}.

A E-selectina, pertencente à família das lectinas do tipo C, é um dos marcadores mais específicos de ativação endotelial. Sua expressão é limitada às células endoteliais e induzida por citocinas inflamatórias. A E-selectina recruta leucócitos mediando seu rolamento para o local da inflamação. Níveis elevados de moléculas de adesão solúveis, como VCAM-1, P-selectina e ICAM-1, também foram relatados em pacientes com COVID-19^{34,35}.

5.3 Proteína C-reativa

A proteína C-reativa (PCR) é uma pentraxina com um papel essencial na resposta imune humana inata. Tradicionalmente é considerada um biomarcador de inflamação, possui propriedades pró-aterogênicas, aumentando a expressão de moléculas de adesão, reduzindo a biodisponibilidade do NO, promovendo vasoconstrição e disfunção endotelial. Também promove a ativação endotelial por meio da expressão de ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas e CCL2, ativa macrófagos que expressam citocinas e fatores teciduais e reduz os fatores vasoativos derivados do endotélio, principalmente o NO, afetando a homeostase vascular. Este processo pode promover a apoptose em células endoteliais e reduzir mecanismos compensatórios importantes para a angiogênese^{36,37}.

Concomitantemente, a PCR aumenta a produção de endotelina 1, um potente vasoconstritor dependente do endotélio, e IL-6, uma citocina pró-inflamatória chave. A PCR é considerada um preditor de aterosclerose e disfunção vascular. Essa proteína é capaz de modificar o fenótipo das células endoteliais e contribuir para a formação de lesões, ruptura de

placas e trombose coronariana. Trata-se, portanto, um biomarcador inflamatório e um mediador da doença vascular³⁸.

5.4 Ligante CD40

O CD40L, pertence à superfamília TNF, é uma proteína solúvel transmembrana tipo II que compreende uma via fisiopatológica ligada à inflamação e aterogênese. É produzido principalmente nas plaquetas, sendo fundamental na hemostasia e na resposta inflamatória na parede vascular. As plaquetas ativadas expressam CD40L em sua superfície, estimulando a secreção de quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, levando ao recrutamento e mobilização de leucócitos para o local da lesão³⁹.

Também pode se desprender da membrana plaquetária, aparecendo sistemicamente. O CD40L tem atividade pró-inflamatória, pró-oxidante e pró-trombótica, aumentando a ativação e agregação plaquetária, e o acoplamento plaqueta-leucocitário e leucócito-endotelial tanto na forma solúvel quanto na plaqueta⁴⁰. De fato, o CD40L leva à inflamação crônica, contribuindo para a disfunção endotelial e aterogênese³⁹.

5.5 CC-quimiocina ligante 2

O aumento da expressão de CCL2 atrai monócitos do lúmen do vaso para o espaço subendotelial e, em associação com moléculas de adesão, facilita a ligação dos monócitos às células endoteliais e a transmigração para a camada íntima. O recrutamento e a migração de monócitos são mediados pelo CCL2. Dentro da íntima, os monócitos se diferenciam em macrófagos e começam a expressar receptores como o receptor eliminador de macrófagos (SR-A), o receptor LDL oxidado semelhante à lecitina 1 (LOX-1) e o CD36, que internalizam o LDL modificado iniciando o processo aterosclerótico. O dano endotelial desencadeia o aumento da expressão de CCL2. A medição dos seus níveis sistêmicos é considerada um biomarcador de disfunção endotelial⁴¹.

5.6 Dimetilarginina assimétrica

A dimetilarginina assimétrica (ADMA) é um inibidor endógeno da NO sintase e um biomarcador de comprometimento do NO e aterosclerose. Os níveis de ADMA se correlacionam independentemente com as medições da função endotelial. Níveis plasmáticos elevados de ADMA estão relacionados com hiperlipidemia, hipertensão, doença arterial coronariana, angina instável, doença renal terminal, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e diabetes. O diabetes tipo 2 tem sido associado a níveis elevados de ADMA que, juntamente com o NO, é determinante da resistência à insulina. A metformina reduziu os níveis séricos de ADMA em 30% em pacientes diabéticos tipo 2. Da mesma forma, a rosiglitazona reduziu os níveis de ADMA em indivíduos hipertensos não diabéticos resistentes à insulina⁴².

5.7 Endocan

Endocan, um proteoglicano solúvel de condroitina/sulfato de dermatano, é expresso e secretado principalmente pelo endotélio ativado. Várias citocinas pró-inflamatórias e fatores pró-angiogênicos regulam positivamente sua síntese e secreção. Níveis elevados de endocan têm sido associados a vários distúrbios cardiometabólicos, como hipertensão, doença renal crônica, doença arterial coronariana, doença hepática gordurosa, diabetes tipo 2 e aterosclerose. Na hipertensão, os níveis de endocan estão positivamente correlacionados com cIMT, níveis de PCR de alta sensibilidade e rigidez arterial^{43,44}.

Na aterosclerose, está envolvido por meio da disfunção endotelial, promovendo inflamação, adesão celular e estresse oxidativo. O endocan aumenta sob condições pró-inflamatórias – IL-1 β , TNF- α e outros fatores pró-inflamatórios elevados –, levando a um aumento adicional de VCAM-1 e ICAM-1, com subsequente adesão de leucócitos ao endotélio e recrutamento e migração de células inflamatórias. Em macrófagos, in vitro, o tratamento com endocan estimulou a produção de NO e ROS e aumentou a expressão de iNOS e PCR. Trata-se, portanto, de um importante preditor de progressão e prognóstico de eventos cardiovasculares⁴⁵.

5.8 Mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima pertencente à superfamília das heme peroxidases, é produzida por neutrófilos, monócitos e macrófagos teciduais ativados. Uma vez ativado, catalisa a formação de ROS – como ácido hipocloroso, radical tirosil e dióxido de nitrogênio –, levando a danos oxidativos de lipídios e proteínas no corpo. Esta enzima é útil no

combate a doenças infecciosas e também pode ser usada para prever o início e a progressão da aterosclerose. A MPO se liga aos glicosaminoglicanos na vasculatura e prejudica a liberação de NO derivado do endotélio, causando disfunção endotelial⁴⁶.

Altos níveis de MPO estão ligados à disfunção endotelial e doença arterial coronariana, enquanto baixos níveis plasmáticos e alguns polimorfismos de MPO são cardioprotetores⁴⁷. O estresse oxidativo, por sua vez, pode promover disfunção endotelial por meio de vários mecanismos, sendo a redução da biodisponibilidade de NO o mais proeminente. O ciclo vicioso associado à produção de ROS pode exceder as defesas antioxidantes e, em última análise, pode ocorrer um incremento nas biomoléculas oxidadas e danos teciduais. O estresse oxidativo desempenha um papel central no desenvolvimento da disfunção endotelial e aterogênese⁴⁸.

5.9 Pentraxina 3

Biomarcador inflamatório e de dano tecidual, a pentraxina 3 (PTX3) pertence à família das proteínas C-reativas, sendo considerada um preditor de recuperação funcional em pacientes de cirurgia cardíaca. Estímulos pró-inflamatórios, lesão ou infecção, citocinas pró-inflamatórias, engajamento do receptor toll-like e porções microbianas induzem a produção de PTX3 por vários tipos de células da linhagem mieloide, fibroblastos, células epiteliais, células mesangiais, células endoteliais vasculares e linfáticas, células musculares lisas, adipócitos, astrócitos e células da microglia⁴⁹.

Envolvida na remodelação da matriz, também desempenha um papel na resistência a alguns patógenos e tem um papel regulador na inflamação e na fertilidade. Uma vez liberada, a PTX3 tem uma ação potencial no diagnóstico e prognóstico de doenças cardiovasculares, além de atuar na imunidade inata, interagindo com vários ligantes microbianos ou endógenos, regulando a inflamação, além da remodelação e reparo tecidual. As múltiplas propriedades funcionais da PTX3 estão relacionadas à capacidade de interagir com diversos ligantes⁴⁹.

Outros marcadores

Os eventos aterotrombóticos são caracterizados por um aumento no estresse oxidativo, ativação de células endoteliais, elevação de várias citocinas/ quimiocinas pró-inflamatórias, ativação plaquetária, aumento nas proteínas da fase aguda, fatores de crescimento angiogênicos, entre outros biomarcadores sistêmicos. O LDL oxidado (oxLDL) é uma molécula pró-inflamatória envolvida em vários eventos ateroscleróticos, incluindo processos iniciais – estímulo na adesão, expressão da molécula e ativação do sistema imunológico – e eventos tardios, como agregação plaquetária e desestabilização da placa aterosclerótica. O estresse oxidativo modifica as partículas de LDL durante a migração na parede dos vasos sanguíneos, sendo o oxLDL um marcador proposto de disfunção endotelial e aterogênese⁵⁰.

Os ácidos graxos livres promovem o aumento nos níveis de ROS e promovem a ativação das vias pró-inflamatórias do fator nuclear- κ B. Por isso, são considerados um biomarcador precoce para dano endotelial e aterosclerose²⁷. O aumento dos níveis de homocisteína e a superprodução de endotelina 1 também estão ligados à disfunção endotelial e ao aumento da rigidez vascular, exercendo um papel importante na medicina personalizada⁵¹.

Após a ativação das células endoteliais, um desequilíbrio entre o ativador do plasminogênio tecidual e seu inibidor endógeno, o inibidor de ativação do plasminogênio-1, promove um estado pró-coagulante. Além disso, o fator de von Willebrand, uma glicoproteína liberada pelas células endoteliais, nutre a coagulação e a ativação plaquetária. O fibrinogênio, uma glicoproteína e biomarcador da função endotelial, é sintetizado principalmente nas células do fígado e megacariócitos, podendo se ligar à superfície da glicoproteína (GP) IIb/IIIa, além de unir as plaquetas entre elas. Também promove a agregação plaquetária e a migração de células musculares lisas e aumenta a viscosidade do sangue e os eventos iniciais no processo aterosclerótico⁵².

Recentemente, níveis séricos de renalase aumentados foram associados à doença microvascular coronariana sintomática em pacientes com dor torácica aguda, tornando a renalase um potencial biomarcador de doença microvascular coronariana⁵³. Em pacientes com COVID-19, marcadores de ativação endotelial – como fator de von Willebrand; trombomodulina; angiopoietina-2; e endoglina, um fator de crescimento transformador β receptor – foram descritos^{54,55}.

6. BIOMARCADORES CELULARES

6.1 Células endoteliais circulantes e micropartículas endoteliais

A função endotelial revela o equilíbrio entre o dano endotelial vascular e o reparo. Existem várias técnicas para quantificar o descolamento de células endoteliais maduras e micropartículas derivadas como um índice de dano endotelial. A ativação ou lesão das células endoteliais promove o descolamento das células endoteliais circulantes (CEC), levando ao seu aumento na circulação. A citometria de fluxo ou a microscopia de fluorescência podem ser usadas para quantificar a células endoteliais. O aumento da CEC na circulação periférica está diretamente associado à extensão do dano endotelial em pacientes com inflamação vascular, aterosclerose e COVID-19⁵⁶.

As micropartículas, as vesículas de membrana (0,1 a 1 µm) liberadas por diferentes tipos de células e CEC, são novos biomarcadores de lesão endotelial, ligadas à aterosclerose e complicações vasculares relacionadas (inflamação, trombose e apoptose). São potenciais biomarcadores de dano vascular e inflamação, sendo seu número circulante capaz de fornecer dados clínicos em indivíduos saudáveis ou pacientes com DCV, como um marcador substituto da função vascular^{57,58}.

As micropartículas endoteliais (EMP), por sua vez, são pequenas vesículas originadas e liberadas pela membrana plasmática de células endoteliais ativadas ou danificadas. Elas carregam moléculas de adesão, enzimas e seus receptores de superfície, além de expressar uma variedade de antígenos constitutivos⁵⁹. Altos níveis de EMP ocorrem quando as células endoteliais são ativadas, apoptóticas e relacionadas à trombogênese e formação de placas ateromatosas, participando também dos processos de inflamação, dano vascular e angiogênese^{60,61}. EMPs derivadas de células endoteliais ativadas podem regular a função de monócitos/ macrófagos, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Altos níveis de EMP têm sido associados à disfunção endotelial em pacientes com doença arterial coronariana⁶².

6.2 Micropartículas plaquetárias

As micropartículas plaquetárias (PMP) são muito abundantes no plasma humano. Estudos descreveram uma relação entre PMP e inflamação, coagulação sanguínea, trombose e progressão do tumor. Elas exercem um papel na regeneração tecidual e na angiogênese. Seus níveis são altos no infarto do miocárdio, diabetes tipo 2 ou hipertensão pulmonar⁶³.

6.3 Micropartículas de monócitos

Micropartículas derivadas de monócitos (MMP) estão relacionadas à disfunção endotelial. Elas podem ativar as células endoteliais, devido ao aumento da inflamação da IL-1β. O tratamento de camundongos ApoE -/- com MPM levou ao acúmulo de macrófagos na parede vascular e promoveu a formação de placas ateroscleróticas. A interação entre MPM e células inflamatórias estimula a doença aterosclerótica em camundongos ApoE -/-⁶⁴.

7. NOVOS BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

7.1 Metaloproteinases de matriz/inibidor tecidual de metaloproteinases

Em estudo, Boumiza et al⁶⁵ avaliaram a relação entre os níveis de metaloproteinases da matriz (MMPs) ou inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e disfunção endotelial em 185 indivíduos obesos, 67 com sobrepeso e 227 não obesos. Eles destacaram que os níveis de MMP-9 ou a razão MMP-9/TIMP-1 poderiam ser preditivos para disfunção endotelial e, com isso, propuseram o uso de MMPs e TIMPs como biomarcadores clínicos em DCVs relacionadas à obesidade, como síndrome metabólica e hipertensão. Geralmente, considera-se que há associação entre MMPs, TIMPs e obesidade, bem como doenças relacionadas à obesidade, incluindo síndrome metabólica⁶⁵.

A disfunção endotelial é um dos primeiros determinantes para doenças relacionadas à obesidade, incluindo hipertensão. Acredita-se agora que as MMPs estejam envolvidas em complicações fisiológicas e patológicas da obesidade ou síndrome metabólica. A MMP-9 pertence a um membro (por exemplo, gelatinase) da família MMP. Portanto, alterações na proteólise mediada por MMPs/TIMPs podem contribuir para muitos estados patológicos (síndrome metabólica e hipertensão). Espera-se que suas descobertas forneçam novos aspectos

para o uso de MMPs e TIMPs como biomarcadores clínicos em doenças cardiovasculares relacionadas à obesidade, como síndrome metabólica e hipertensão⁶⁵.

Ainda no estudo de Boumiza et al⁶⁵, foi observado que os parâmetros medidos incluíam dilatação mediada por fluxo, hiperemia de reatividade cutânea microvascular (usando laser Doppler) e vasodilatação microvascular induzida por cloreto de acetilcolina (iontoforese laser Doppler) e condutância vascular cutânea. A metodologia é usada para testar disfunção endotelial. A ligação de dados de disfunção endotelial obtidos com os dados acima e de MMP e TIMP fornece evidências cientificamente lógicas de MMP e TIMP como biomarcadores de disfunção endotelial⁶⁵.

Olejarz et al⁶⁶, por sua vez, mostraram em seu estudo que é consistente a noção de MMP-7 e MMP-9 como biomarcadores de disfunção endotelial para instabilidade de placa aterosclerótica. Atualmente é bem reconhecido que MMPs podem ser secretadas por células endoteliais. MMP-9 (matrilisina-1) participa da disfunção endotelial por várias vias, como aumento da migração de células inflamatórias e invasão na parede arterial, participação no efeito oxLDL e apoptose endotelial, enquanto MMP-7 (gelatinase-B) desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de placa, neovascularização, calcificação, além de ativação e desestabilização de placa. O aumento da atividade de MMP-7 e MMP-9 foi observado em placas instáveis, e a maior expressão tecidual de MMP-9 foi encontrada em placas do tipo lipídico em comparação com placas dos tipos necrótico e inflamatório-erosivo.

Tabela 2. Novos biomarcadores solúveis e de componentes celulares de disfunção endotelial em doenças cardiovasculares.

BIOMARCADORES	NOMES ALTERNATIVOS	USO POTENCIAL
MMPs/TIMPs	Metaloproteinases de matriz/inibidor tecidual de metaloproteinases	Os níveis de MMP-9 ou a razão MMP-9/TIMP-1 podem ser preditivos de disfunção endotelial; usando MMPs e TIMPs como biomarcadores clínicos em DCVs relacionadas à obesidade, como síndrome metabólica e hipertensão; MMP-7 e MMP-9 como biomarcadores de disfunção endotelial para instabilidade da placa aterosclerótica.
ANGPT L2	ANGPTL2 derivado de células endoteliais (um mediador pró-inflamatório)	Um biomarcador candidato emergente para DCV, particularmente aterosclerose.
Endoglina	CD105 ou TGF-ββ receptor III (uma glicoproteína transmembrana homodimérica)	A endoglina pode ser usada como um biomarcador de disfunção endotelial em DCV (por exemplo, hipercolesterolemia, aterosclerose e hipertensão) e como um possível marcador do benefício do tratamento com atorvastatina na aterosclerose.
Homocisteína	Um aminoácido não proteinogênico derivado da metionina	É provável que a homocisteína atue como um preditor independente de resultados cardiovasculares adversos; a concentração basal de homocisteína provavelmente é um preditor do benefício da terapia anti-

hipertensiva e um alvo
terapêutico crítico.

7.2 Proteína 2 relacionada à angiopoietina (ANGPT L2)

Trata-se de um mediador pró-inflamatório, que promove inflamação vascular e aterosclerose^{67,68}. Horio et al⁶⁷ relataram que os níveis de ANGPTL2 no tecido da aorta do camundongo knockout da apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) foram positivamente correlacionados com a gravidade da aterosclerose. A ANGPTL2 é altamente expressa em células endoteliais e macrófagos que infiltram placas ateromatosas e promove inflamação vascular por meio de uma via de sinalização do fator nuclear (NF)- κ B em células endoteliais e aumento da quimiotaxia de monócitos/macrófagos. Os autores sugerem em seu estudo que a ANGPTL2 derivada de células endoteliais acelera a inflamação vascular, levando à disfunção endotelial e ao desenvolvimento de aterosclerose.

Em seu estudo, Hata et al⁶⁸ analisaram as concentrações séricas de ANGPTL2 em 3005 japoneses residentes na comunidade e com 40 anos sem histórico de DCV. Eles observaram que a taxa de incidência de DCV ajustada por idade e sexo aumentou significativamente e linearmente com o aumento das concentrações séricas de ANGPTL2. Essas concentrações elevadas foram consideradas um fator de risco significativo para DCV, após o ajuste para fatores de risco convencionais diferentes dos componentes da síndrome metabólica. Com isso, os autores acreditam que os níveis séricos elevados de ANGPTL2 são um novo fator de risco para o desenvolvimento de DCV na população em geral.

Esses resultados indicam que a ANGPTL2 poderia ser usada como um biomarcador candidato emergente para DCV, particularmente aterosclerose. No entanto, dados de uma meta-análise de ANGPTL2 de pacientes com aterosclerose ainda são necessários em estudo longitudinal, para provar a ANGPTL2 como um biomarcador confiável^{67,68}.

7.3 Endoglina (CD105 ou TGF- β receptor III)

Corresponde a uma glicoproteína transmembrana homodimérica, expressa principalmente em células endoteliais de vasos sanguíneos. Uma forma solúvel de endoglina é conhecida como um domínio extracelular da endoglin de membrana de comprimento total, que é liberada na circulação sanguínea, após clivagem proteolítica da região justamembrana da endoglina ligada à membrana sob condições patológicas. Evidências crescentes indicam que a endoglin desempenha um papel importante na regulação da disfunção endotelial induzida por colesterol⁶⁹.

Vicen et al⁷⁰ verificaram que células endoteliais aórticas humanas tratadas com 7-cetocolesterol, em camundongos deficientes em apolipoproteína E/receptor de LDL (ApoE2/2/LDLR2/2) propensos à aterosclerose, desenvolveram hipercolesterolemia em associação com níveis aumentados de P-selectina e endoglina, bem como uma interrupção do metabolismo do NO. Parece haver uma correção entre a expressão aumentada de endoglina por hipercolesterolemia e a disfunção endotelial, que é seguida pelo desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, por adesão e transmigração de células inflamatórias via células endoteliais ativadas ou disfuncionais.

Em estudos com camundongos com knockout duplo do receptor apoE/LDL (apoE/LDLR), Strasky et al⁷¹ demonstraram que uma dieta rica em colesterol resultou em um aumento significativo dos níveis de colesterol e endoglina no soro, assim como no aumento do tamanho da placa de aterosclerose na aorta. Rathouska et al⁷², por sua vez, revelaram que o tratamento com atorvastatina é capaz de reduzir os níveis de colesterol e o tamanho da placa, além dos níveis da forma solúvel de endoglina. Os autores também propuseram que o aumento da forma solúvel de endoglina pode ser usado como um biomarcador de disfunção endotelial em DCV, como, por exemplo, hipercolesterolemia, aterosclerose e hipertensão, e como um possível marcador do benefício do tratamento com atorvastatina na aterosclerose.

7.4 Homocisteína

Foi demonstrado que a homocisteína, um aminoácido não proteinogênico derivado da metionina, é um forte preditor e fator de risco independente para eventos isquêmicos arteriais. Além disso, foi relatada a associação da homocisteína elevada com síndrome metabólica e diabetes⁷³. Wald et al⁷⁴ identificaram que a concentração sérica do aminoácido homocisteína foi positivamente associada ao risco de doença cardíaca isquêmica, trombose venosa profunda e embolia pulmonar, e acidente vascular cerebral. Há fortes evidências de que a associação entre homocisteína e doença cardiovascular é causal. Nesse caso, os autores consideram que a

redução das concentrações de homocisteína em 3umol/L dos níveis atuais diminuiria o risco de doença cardíaca isquêmica em 16%; trombose venosa profunda em 25%; e acidente vascular cerebral em 24%. Esses resultados indicam que a concentração sérica de homocisteína provavelmente atua como um preditor independente de resultados cardiovasculares adversos.

Um estudo subsequente mostrou que concentrações elevadas de homocisteína diminuíram significativamente o efeito anti-hipertensivo dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina (enalapril), em pacientes hipertensos não tratados anteriormente. Esses resultados indicam que a concentração basal de homocisteína é um possível preditor para o benefício da terapia anti-hipertensiva e um alvo terapêutico crítico. Existem mecanismos pelos quais a homocisteína resulta em dano vascular, sendo um deles a indução de disfunção endotelial. A homocisteína elevada pode promover a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e agir sinergicamente com a angiotensina II para causar danos à vasculatura e levar à deterioração da função endotelial⁷⁵.

Ao avaliarem o papel da homocisteinilação da ECA na disfunção endotelial de artérias coronárias e mesentéricas, obtidas de ratos Wistar machos, Huang et al⁷³ demonstraram que o aumento da produção local/vascular de homocisteína estimulou a disfunção endotelial. O mecanismo proposto, pelo qual os níveis elevados de hiper-homocistinemia reduziram a eficácia do enalapril, resulta no efeito direto da hiper-homocistinemia, que causa disfunção vascular independentemente do sistema renina-angiotensina. Analisados de forma criteriosa, esses dados fornecem a justificativa da homocisteína como um biomarcador candidato de disfunção endotelial para doenças cardiovasculares.

8. LIMITAÇÕES DOS BIOMARCADORES DE ATIVAÇÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NO AMBIENTE CLÍNICO

Embora os biomarcadores de ativação e disfunção endotelial desempenhem um papel importante no diagnóstico da aterosclerose, algumas limitações permanecem. Por exemplo, as limitações tecnológicas atuais na purificação de micropartículas circulantes se mantêm e métodos padronizados de detecção de micropartículas estão faltando^{76,77}. Além disso, como os biomarcadores endoteliais de lesão vascular em humanos, os biomarcadores endoteliais de DCV em humanos geralmente não são específicos e têm sensibilidade limitada. Embora sejam úteis para o clínico na identificação de fatores de alto risco, diagnóstico de doenças, monitoramento do prognóstico e fornecimento de intervenção terapêutica, alguns fatores podem limitar esses biomarcadores para uso clínico^{78,79}.

A princípio, os poucos exemplos disponíveis em estudos clínicos podem ser uma barreira significativa para desenvolver biomarcadores confiáveis. Portanto, grandes ensaios clínicos multicêntricos para avaliação são necessários. Sobre a sensibilidade e especificidade de um biomarcador, é fundamental avaliar o conteúdo de informação de um biomarcador em uma faixa de valores, frequentemente com o uso de curvas ROC. Porém, a metodologia para esse propósito raramente foi usada nos estudos disponíveis sobre o tema⁷⁹.

Alguns dados obtidos de estudos clínicos, por sua vez, são controversos e frequentemente sob especulação. Os mecanismos para lidar com a contradição ainda estão faltando. No contexto de micropartículas endoteliais circulantes, usá-las como biomarcador na prática clínica também é limitado. Isso provavelmente se deve à falta de métodos padronizados de micropartículas^{77,78}.

Geralmente, os biomarcadores derivados do endotélio são ligados a outros biomarcadores de plaquetas, leucócitos, células musculares lisas de vasos sanguíneos e células-tronco/progenitoras cardíacas. Sem a cooperação de outros biomarcadores, o uso isolado de biomarcadores endoteliais limita sua aplicação. Finalmente, a falta de compreensão das diferenças em biomarcadores entre ativação e disfunção endotelial também pode dificultar a interpretação correta do desenvolvimento e resultado de doenças. Independentemente das limitações, alguns biomarcadores podem servir como ferramentas de pesquisa, fornecendo insights sobre mecanismos de doenças e podem ser biomarcadores candidatos muito promissores de DCVs, conforme seu interesse dê origem a pesquisas mais detalhadas a respeito⁷⁹.

REFERÊNCIAS

1. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:620–36.
2. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411–5.
3. Libby P, Aikawa M, Jain M. Vascular endothelium and atherosclerosis. In: *The Vascular Endothelium II*. Berlin/Heidelberg: Springer; 2006. p. 285–306.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135–43.
5. Clapp BR, Hirschfield GM, Storry C, Gallimore JR, Stidwill RP, Singer M, et al. Inflammation and endothelial function: Direct vascular effects of human C-reactive protein on nitric oxide bioavailability. *Circulation*. 2005;111:1530–6.
6. Palmer RM, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524–6.
7. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies. *Pharmacol Rev*. 2021;73:924–67.
8. Gandaglia G, Briganti A, Jackson G, Kloner RA, Montorsi F, Montorsi P, et al. A systematic review of the association between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Eur Urol*. 2014;65:968–78.
9. Cartledge J, Minhas S, Eardley I. The role of nitric oxide in penile erection. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2:95–107.
10. Weng W, Kong SX, Ganguly R, Hersloev M, Brett J, Hobbs T, et al. The prevalence of cardiovascular disease by vascular bed and impact on healthcare costs in a large, real-world population with type 2 diabetes. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2020;3:e00106.
11. Ibanez B, Fuster V. CANTOS: A gigantic proof-of-concept trial. *Circ Res*. 2017;121:1320–2.
12. Ridker PM. Mortality Differences associated with treatment responses in CANTOS and FOURIER: Insights and implications. *Circulation*. 2017;137:1763–6.
13. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373:2117–28.
14. Tanaka A, Shimabukuro M, Machii N, Teragawa H, Okada Y, Shima KR, et al. Effect of empagliflozin on endothelial function in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease: results from the multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind EMBLEM Trial. *Diabetes Care*. 2019;42:e159–61.
15. Tak BT, Balci KG, Erken H, Gereide DM, Tak S, Goksuluk H, et al. Evaluation of endothelial dysfunction with flow-mediated dilatation after transradial coronary angiography. *Acta Cardiol*. 2017;72:305–10.
16. Mortensen SP, Nyberg M, Thaning P, Saltin B, Hellsten Y. Adenosine contributes to blood flow regulation in the exercising human leg by increasing prostaglandin and nitric oxide formation. *Hypertension*. 2009;53:993–9.
17. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:1235–41.

18. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Noninvasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111–5.
19. Green D. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol*. 2005;99:1233–4; discussion 1237–8.
20. Halcox JP, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, et al. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation*. 2009;119:1005–12.
21. Grenon SM, Chong K, Alley H, Nosova E, Gasper W, Hiramoto J, et al. Walking disability in patients with peripheral artery disease is associated with arterial endothelial function. *J Vasc Surg*. 2014;59:1025–34.
22. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, Atkinson G. Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: Does nitric oxide matter? *Hypertension*. 2011;57:363–9.
23. Mortensen SP, Askew CD, Walker M, Nyberg M, Hellsten Y. The hyperaemic response to passive leg movement is dependent on nitric oxide: A new tool to evaluate endothelial nitric oxide function. *J Physiol*. 2012;590:4391–400.
24. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Kuvin JT Jr, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:2137–41.
25. Holder SM, Bruno RM, Shkredova DA, Dawson EA, Jones H, Hopkins ND, et al. Reference intervals for brachial artery flow-mediated dilation and the relation with cardiovascular risk factors. *Hypertension*. 2021;77:1469–80.
26. Ruparel N, Choudhury R. Inflammation and atherosclerosis: what is on the horizon? *Heart*. 2020;106:80–5.
27. Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pages M. Circulating biomarkers. *Thromb Res*. 2012;130(1):S12–5.
28. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105:546–9.
29. 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;15:1607–38.
30. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1379–86.
31. 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;36:423–6.
32. 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;351:88–92.
33. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone 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;13:197–204.
34. Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*. 2007;26:477–89.

35. Spadaro S, Fogagnolo A, Campo G, Zucchetti O, Verri M, Ottaviani I, Tunstall T, Grasso S, Scaramuzzo V, Murgolo F, Marangoni E, Viecei Dalla Sega F, Fortini F, Pavasini R, Rizzo P, Ferrari R, Papi A, Volta CA, Contoli M. Markers of endothelial and epithelial pulmonary injury in mechanically ventilated COVID-19 ICU patients. *Crit Care*. 2021;25:74.
36. Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*. 2003;107:370–1.
37. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002;106:913–9.
38. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*. 2002;105:1890–6.
39. Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Ann Med*. 2011;43:331–40.
40. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2428–34.
41. 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;108:1917–23.
42. Dowsett L, Higgins E, Alanazi S, Alshuwayer NA, Leiper FC, Leiper J. ADMA: a key player in the relationship between vascular dysfunction and inflammation in atherosclerosis. *J Clin Med*. 2020;9:3026.
43. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, Devos R, Tonnel AB. ESM-1 is a novel human endothelial cell specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem*. 1996;271:20458–64.
44. Balta S, Demirkol S, Ozturk C, Yildirim AO, Demir M, Celik T. The relation between endocan levels and subclinic atherosclerosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016;22:495–6.
45. Kartik Kumar S, Muthusamy S, Kadhivel S, Mani KP. In-silico and invitro analysis of endocan interaction with statins. *Int J Biol Macromol*. 2020;146:1087–99.
46. Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep*. 2007;7:257–64.
47. Tsimikas S. Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2006;98:9P-17P.
48. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:1285–95.
49. Ferratini M, Ripamonti V, Masson S, Grati P, Racca V, Cuccovillo I, Raimondi E, Capomolla S, Macchi C, Coruzzi P, Vago T, Calvo M, Mantovani A, Latini R. Pentraxin-3 predicts functional recovery and 1-year major adverse cardiovascular events after rehabilitation of cardiac surgery patients. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2012;32:17–24.
50. Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep*. 2007;7:257–64.
51. Torres Crigna A, Link B, Samec M, Giordano FA, Kubatka P, Golubnitschaja O. Endothelin-1 axes in the framework of predictive, preventive and personalised (3P) medicine. *EPMA J*. 2021;12:1–41.

52. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115:1285–95.
53. Safdar B, Guo X, Johnson C, D'Onofrio G, Dziura J, Sinusas AJ, Testani J, Rao V, Desir G. Elevated renin levels in patients with acute coronary microvascular dysfunction - a possible biomarker for ischemia. *Int J Cardiol*. 2019;279:155–61.
54. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, Chang CH, Zhang H, Bahel P, Baluha A, Bar N, Bona RD, Burns AJ, Dela Cruz CS, Dumont A, Halene S, Hwa J, Koff J, Menninger H, Neparidze N, Price C, Siner JM, Tormey C, Rinder HM, Chun HJ, Lee AI. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol*. 2020;7:e575–82.
55. Smadja DM, Guerin CL, Chocron R, Yatim N, Boussier J, Gendron N, Khider L, Hadjadj J, Goudot G, Debuc B, Juvin P, Hauw-Berlemont C, Augy JL, Peron N, Messas E, Planquette B, Sanchez O, Charbit B, Gaussem P, Duffy D, Terrier B, Mirault T, Diehl JL. Angiotensin-2 as a marker of endothelial activation is a good predictor factor for intensive care unit admission of COVID-19 patients. *Angiogenesis*. 2020;23:611–20.
56. Guervilly C, Burtey S, Sabatier F, Cauchois R, Lano G, Abdili E, Daviet F, Arnaud L, Brunet P, Hraiech S, Jourde-Chiche N, Koubi M, Lacroix R, Pietri L, Berda Y, Robert T, Degioanni C, Velier M, Papazian L, Kaplanski G, Dignat-George F. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID -19. *J Infect Dis*. 2020;222:1789–93.
57. Mahajan K. Microparticles in atherosclerosis: biomarkers of disease. *J Clin Exp Cardiol*. 2015;6:1.
58. Boulanger CM, Loyer X, Rautou PE, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14:259–72.
59. Hoyer FF, Nickenig G, Werner N. Microparticles-messengers of biological information. *J Cell Mol Med*. 2010;14:2250–6
60. Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, Flender A, Paul K, Alhusseiny A, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA- 222-dependent mechanism. *J Cell Mol Med*. 2015;19:2202–14.
61. Coronado-Velázquez D, Betanzos A, Serrano-Luna J, Shibayama M. An in vitro model of the blood-brain barrier: *Naegleria fowleri* affects the tight junction proteins and activates the microvascular endothelial cells. *J Eukaryot Microbiol*. 2018;65:804–19
62. Wang Y, Liu J, Chen X, Sun H, Peng S, Kuang Y, Pi J, Zhuang T, Zhang L, Yu Z, Tomlinson B, Chan P, Chen Y, Zhang Y, Li Y. Dysfunctional endothelial-derived microparticles promote inflammatory macrophage formation via NF- κ B and IL-1 β signal pathways. *J Cell Mol Med*. 2019;23:476–86.
63. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85:639–46.
64. Hoyer FF, Giesen MK, Franca CN, Lutjohann D, Nickenig G, Werner N. Monocytic microparticles promote atherogenesis by modulating inflammatory cells in mice. *J Cell Mol Med*. 2012;16:2777–88.
65. Boumiza S, Chahed K, Tabka Z, Jacob M, Norel X, Ozen G. MMPs and TIMPs levels are correlated with anthropometric parameters, blood pressure, and endothelial function in obesity. *Scientific Reports*. 2021; 11: 20052.

66. Olejarz W, Łacheta D, Ubiak-Tomaszewska G. Matrix metalloproteinases as biomarkers of atherosclerotic plaque instability. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 3946.
67. Horio E, Kadomatsu T, Miyata K, Arai Y, Hosokawa K, Doi Y, et al. Role of endothelial cell-derived ANGPTL2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014; 34: 790–800.
68. Hata J, Mukai N, Nagata M, Ohara T, Yoshida D, Kishimoto H, et al. Serum Angiopoietin–Like Protein 2 is a Novel Risk Factor for Cardiovascular Disease in the Community. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2016; 36: 1686–1691.
69. Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 2015; 243: 383–388.
70. Vicen M, Vitverova B, Havelek R, Blazickova K, Machacek M, Rathouska J, *et al.* Regulation and role of endoglin in cholesterol-induced endothelial and vascular dysfunction in vivo and in vitro. *FASEB Journal*. 2019; 33: 6099–6114.
71. Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brackova E, Kudlackova Z, et al. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circulation Journal*. 2011; 75: 1747–1755.
72. Rathouska J, Vecerova L, Strasky Z, Slanarova M, Brackova E, Mullerova Z, et al. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacological Research*. 2011; 64: 53–59.
73. Huang A, Pinto JT, Froogh G, Kandhi S, Qin J, Wolin MS, et al. Role of homocysteinylation of ACE in endothelial dysfunction of arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2015; 308: H92–H100.
74. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *British Medical Journal*. 2002; 325: 1202.
75. Qin X, Li Y, Sun N, Wang H, Zhang Y, Wang J, et al. Elevated homocysteine concentrations decrease the antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertensive patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017; 37: 166–172.
76. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007; 66: 159–165.
77. Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, Stern JNH, Ponomarev ED, Duckett L, et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biology*. 2013; 14: 23.
78. Kerns W, Schwartz L, Blanchard K, Burchiel S, Essayan D, Fung E, et al. Drug-induced vascular injury—a quest for biomarkers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 203: 62–87.
79. Vasan RS. Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2006; 113: 2335–2362.