



CARDIOLOGÍA DEL ADULTO - TRABAJOS LIBRES

Relación entre el estrés de fricción endotelial y la vasodilatación mediada por flujo en primigestantes saludables

*Relationship between vascular shear stress and flow-mediated dilation in healthy pregnant women*Robinson Ramírez-Vélez, Ft. PhD⁽¹⁾

Cali, Colombia.

La vasodilatación mediada por flujo (VMF) es una medida fisiológica que permite estimar de manera no invasiva la función endotelial. De igual forma, se la asocia con algunos factores de riesgo cardiovascular y con eventos cardiovasculares.

El objetivo de este estudio es presentar la primera exploración de la normalización de los datos de la VMF durante la gestación y examinar la relación del estrés de fricción endotelial (EFE) y la normalización de la vasodilatación mediada por flujo (nVMF) en esta población. Se encontró una relación entre la VMF y la nVMF ($R^2=0,782$, $p<0,05$), pero no entre la VMF y el EFE ($R^2=0,782$, $p>0,05$), ni entre el EFE y la nVMF ($R^2=0,013$, $p>0,05$). Futuras investigaciones, cuidadosamente diseñadas, podrían estudiar esta propuesta en diferentes poblaciones. Los autores sugieren que la VMF y la nVMF, alguna vez podrán ser consideradas como herramientas con aplicabilidad clínica para estimar el riesgo cardiovascular.

PALABRAS CLAVE: embarazo, función endotelial, estrés de fricción.

Flow-mediated vasodilation (FMV) is a physiological measure to non-invasively estimate endothelial function. Similarly, it is associated with some cardiovascular risk factors and cardiovascular events.

The aim of this study is to present the first exploration of the standardization of FMV data during pregnancy and examine the relationship of endothelial friction stress (EFE) and the normalization of flow-mediated vasodilation (nMFV) in this population. A relationship between VMF and nVMF ($R^2 = 0.782$, $p < 0.05$) was found, but not between the VMF and the EFE ($R^2 = 0.782$, $p > 0.05$) or between the EFE and nVMF ($R^2 = 0.013$, $p > 0.05$). Future research, carefully designed, could examine this proposal in different populations. We suggest that MFV and nMFV, may ever be seen as tools with clinical applications to estimate cardiovascular risk.

KEYWORDS: pregnancy, endothelial function, shear stress.

(Rev Colomb Cardiol 2011; 18: 324-329)

(1) Grupo de Nutrición. Universidad del Valle, Cali. Colombia.

Correspondencia: Dr. Robinson Ramírez-Vélez. Universidad del Valle. Calle 4B No. 36-00 Sede San Fernando. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Edificio 116. Teléfono (572) - 518 56 03. Cali, Colombia. Correo electrónico: robin640@hotmail.com

Recibido: 10/08/2010. Aceptado: 20/09/2011.

Introducción

Desde la introducción de pruebas de reactividad vascular en 1992 por Celermajer y colaboradores (1), la medición de la función endotelial por medio de ecografía de alta frecuencia de la arteria braquial, ha demostrado ser una herramienta de investigación eficaz para la evaluación del riesgo cardiovascular (2). Su interpretación se basa en la modificación porcentual del diámetro de la arteria braquial mediante hiperemia reactiva, observada por medio de transductores de alta resolución generalmente a partir de 7 MHz. Los valores de hiperemia reactiva mayores de 10% para hombres y de 15% para mujeres, demuestran alta sensibilidad en la identificación de enfermedad arterial coronaria en ambos sexos (3). Chequer y colaboradores (4) reportaron una correlación significativa entre la hiperemia reactiva y el grosor medio-intimal (GMI) de la arteria carótida, que también es un indicador precoz de aterosclerosis (r de Spearman = 0,315; $p = 0,042$). Otros autores han demostrado que la disfunción endotelial medida por el deterioro de la vasodilatación mediada por flujo (VDM) en la arteria braquial, predice un aumento del riesgo cardiovascular futuro (5-7). La importancia biológica, la relativa sencillez y el carácter no invasivo de la técnica han motivado el crecimiento dramático en la investigación en los últimos quince años (8).

Aunque la medición de la VMF en la arteria braquial es prometedora como un marcador indirecto de riesgo cardiovascular, la especificidad para la predicción del riesgo futuro sigue siendo baja. Ésta posiblemente se explique, en parte, por las limitaciones técnicas existentes tanto del *hardware* y el *software* necesarios para su determinación, así como por la heterogeneidad de las técnicas utilizadas para provocar, medir e informar la VMF. Sin embargo, con el conocimiento actual, los mecanismos, interacciones y factores de confusión que influyen en la medida de la VMF continúan siendo un factor de alta variabilidad.

De manera general, la VMF de la arteria braquial depende, de cierto modo, del estrés de fricción aplicado sobre el endotelio. Se ha propuesto que en el sistema cardiovascular del mamífero, el endotelio presenta respuestas singulares a las fuerzas del flujo sanguíneo: el flujo pulsátil y el estrés de fricción son estímulos fisiológicos responsables, de alguna manera, de la liberación basal de óxido nítrico (9, 10). El estrés de fricción activa cascadas de señalización en el endotelio vascular que conducen a una respuesta vasodilatadora. La VMF se

lleva a cabo a través de hiperemia reactiva, mediante la oclusión temporal del flujo sanguíneo en el antebrazo y el brazo, por lo general con una simple presión arterial mediante el uso de un balón o manguito insuflado por encima de la presión arterial sistólica del individuo. La isquemia secundaria a la oclusión conduce a la vasodilatación compensadora de los microvasos de resistencia distal bajo la influencia de múltiples moléculas vasoactivas, entre las que se incluyen adenosina, potasio, iones de hidrógeno, peróxido de hidrógeno (11), y óxido nítrico (12). La liberación del manguito de isquemia, después de cinco minutos, conduce a un aumento de sustancias vasoactivas que provocan un efecto vasodilatador en la arteria braquial. La velocidad máxima del flujo sanguíneo se detecta a través del análisis de señales Doppler pulsado, de manera inmediata o 15 segundos después de la liberación del manguito, mientras que el diámetro máximo de la arteria braquial se determina aproximadamente 60 segundos luego de la liberación, y 45 a 60 segundos después del pico de flujo hiperémico. La evaluación del «área bajo la curva» del diámetro versus el tiempo de isquemia del manguito puede ofrecer información adicional (13). Es importante medir el diámetro de la arteria braquial en el mismo período del ciclo cardíaco, para evitar cualquier efecto de la tensión arterial sobre las mediciones. El estrés de fricción endotelial (EFE), depende directamente de la velocidad del flujo y la viscosidad de la sangre y es inversamente dependiente del diámetro calculado en la arteria braquial en: ($\text{dinas} \cdot \text{cm}^{-2}$), utilizando la fórmula:

$$\text{EFE} = (V_m \cdot D^{-1}) \quad V_m = \text{velocidad media o pico de la sangre (cm s}^{-1}\text{) y } D^{-1} = \text{diámetro basal braquial arterial medio (cm)}$$

A menudo, se determina como una medida para calcular el EFE en los entornos donde la viscosidad sanguínea no puede medirse directamente (8).

Pese a que el EFE parece relacionarse con algunos factores de riesgo y la hiperemia reactiva emerge como un predictor independiente de riesgo cardiovascular (14), la variabilidad en las respuestas de esta última puede introducir errores en las mediciones de la VMF, reduciendo la especificidad y el valor como un marcador de riesgo cardiovascular. Estudios experimentales en sujetos sanos en los que se emplean medidas repetidas de VMF de la arteria braquial en un mismo individuo, muestran una alta influencia del EFE (sobre-estimación de la medida), mientras que la normalización de la VMF (nVMF) elimina el efecto ejercido por el EFE (8, 12, 15).

Con base en estos estudios algunos investigadores abogan por la normalización de todas las mediciones de la VMF a los estímulos del EFE, lo que sugiere que la normalización aumentará la validez, justificando la verdadera medida de la función endotelial.

El embarazo es un estado fisiológico que se caracteriza por grandes cambios hemodinámicos como aumento de la frecuencia cardíaca en reposo, aumento del gasto cardíaco y disminución de la resistencia vascular periférica. Esta última parece estar mediada, en gran proporción, por un aumento de la VMF (16), la cual ha se asociado con el incremento de la producción de óxido nítrico (17, 18). Durante el embarazo, a pesar de que aumenta la producción de óxido nítrico, también se desarrollan estados moderados de inflamación sistémica (19) y de estrés oxidativo (20), relacionados con el aumento de radicales libres de oxígeno (RLO) (21). Cuando existe un desbalance entre la síntesis de óxido nítrico y la de RLO, puede haber disfunción endotelial, que usualmente se caracteriza por la reducción en la actividad de la óxido-nítrico-sintasa endotelial (enzima productora de óxido nítrico), y/o por la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (22).

Una menor VMF se considera como un evento clave en la aparición de complicaciones propias del embarazo tales como pre-eclampsia (23) y diabetes gestacional (24, 25). Así pues, hoy se cree que mantener una función endotelial adecuada durante el curso normal del embarazo, disminuiría el riesgo de aparición de estas patologías asociadas con la función vascular y por lo tanto, de morbilidad materna y fetal. El objetivo de este estudio es presentar la primera exploración de la normalización de los datos de la VMF durante la gestación y examinar la relación del EFE y la nVMF en esta población.

Material y métodos

Población y muestra

Se invitó a participar, de manera voluntaria, a 67 primigestantes aparentemente sanas que asistían a control prenatal usual a tres centros de salud pertenecientes a la Empresa Social del Estado (ESE) Ladera de Cali. Los criterios de exclusión, para los cuales se tuvieron en cuenta las contraindicaciones obstétricas o médicas del *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) 2003 (26), fueron: edad menor de 16 o mayor de 30 años, edad gestacional menor de 16 o mayor de 20 semanas (determinada por fecha de última menstua-

ción o ecografía de primer trimestre). Presentar los siguientes antecedentes patológicos y/o ginecológicos: cirugía o trauma mayor en el último año, diagnóstico de cáncer, diagnóstico de incompetencia cervical, antecedentes de dos o más abortos espontáneos, embarazo múltiple, hemorragia vaginal o amenaza de aborto, diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma o bronquitis, infecciones sistémicas, antecedente de problemas renales, enfermedad osteomuscular, enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial no controlada y polihidramnios u oligohidramnios.

Procedimientos

A quienes aceptaron y firmaron el consentimiento informado se les realizó un examen médico y una encuesta de antecedentes personales, familiares, historia gineco-obstétrica y de estilo de vida, y se citaron en ayunas al Laboratorio de Proteínas y Enzimas de la Universidad del Valle para los siguientes procedimientos:

Medición de la VMF

Se determinó con ecógrafo marca Siemens SG-60® de acuerdo con la técnica descrita por Celermajer y colaboradores (1) y el *International Brachial Artery Reactivity Task Force* (5); previamente, esta prueba fue validada en Colombia (27, 28). La prueba se realizó en una habitación sin estímulos sonoros o visuales y a temperatura controlada. El flujo de la arteria se calculó para cada medición multiplicando la integral tiempo-velocidad (corregida para el ángulo) por la frecuencia cardíaca y el área del vaso. Se midió por triplicado: el diámetro basal de la arteria braquial (DBAB) y el diámetro pico pos-hiperemia (DPPH). La VMF se calculó con la siguiente fórmula:

$$[(\text{promedio DPPH} - \text{promedio DBAB})/\text{promedio DBAB}] \times 100.$$

Medición del estrés de fricción endotelial

Se calculó el estrés de fricción endotelial (EFE) de la arteria braquial ($\text{dinas} \cdot \text{cm}^{-2}$) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{EFE} = (V_m \cdot D^{-1}) \quad V_m = \text{velocidad media o pico de la sangre (cm s}^{-1}\text{) y } D^{-1} = \text{diámetro basal braquial arterial medio (cm) (8).}$$

Con este resultado se normalizó la VMF (nVMF) mediante la ecuación: $\text{nVMF} = \% \text{VMF}/\text{EFE}$ (8).

Análisis estadístico

Se realizó análisis descriptivo univariado para determinar la distribución de frecuencias y medidas de tendencia central y dispersión en las variables sociodemográficas y clínicas. La normalidad de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el coeficiente de correlación (R^2) entre la nVMF, la VMF y el EFE. Todas las pruebas se efectuaron con el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (Graphpad Instat, Graphpad Software, University of London, London, UK). Se consideró significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

La información demográfica y vascular de las participantes se resume en la tabla 1. Al estudiar la relación entre la nVMF, la VMF y el EFE, se encontró una clara relación entre la VMF y la nVMF ($R^2=0,782$, $p<0,05$) (Figura 1B).

No se encontraron relaciones entre la VMF y el EFE ($R^2=0,782$, $p>0,05$) (Figura 1A), ni entre el EFE y la nVMF ($R^2=0,013$, $p>0,05$) (Figura 1C).

Tabla 1.
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y VASCULARES DE LAS MUJERES EMBARAZADAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

Variables	Media $\pm$ DE
Peso (kg)	56,50 $\pm$ 8,03
Talla (m)	1,54 $\pm$ 0,06
FC Rep. (lat/min)	74,06 $\pm$ 10,63
PAS Rep. (mm Hg)	110,24 $\pm$ 11,33
PAD Rep. (mm Hg)	66,06 $\pm$ 7,83
PAM (mm Hg)	88,12 $\pm$ 7,06
VPB* (cm/s)	29,00 $\pm$ 7,03
VPPH* (cm/s)	53,03 $\pm$ 14,43
DBAB* (mm)	2,855 $\pm$ 0,39
DPPH* (mm)	3,167 $\pm$ 0,33
VMF* (%)	11,92 $\pm$ 9,46
nVMF*	0,12 $\pm$ 0,11
EFE	102,85 $\pm$ 27,04

FC: frecuencia cardíaca, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica, PAM: presión arterial media, VPB: velocidad pico basal, VPPH: velocidad pico post hiperemia, DBAB: diámetro basal de la arteria braquial, DPPH: diámetro pico post hiperemia, VMF: vasodilatación mediada por flujo, nVMF: vasodilatación medida por flujo normalizada. EFE: estrés de fricción endotelial.

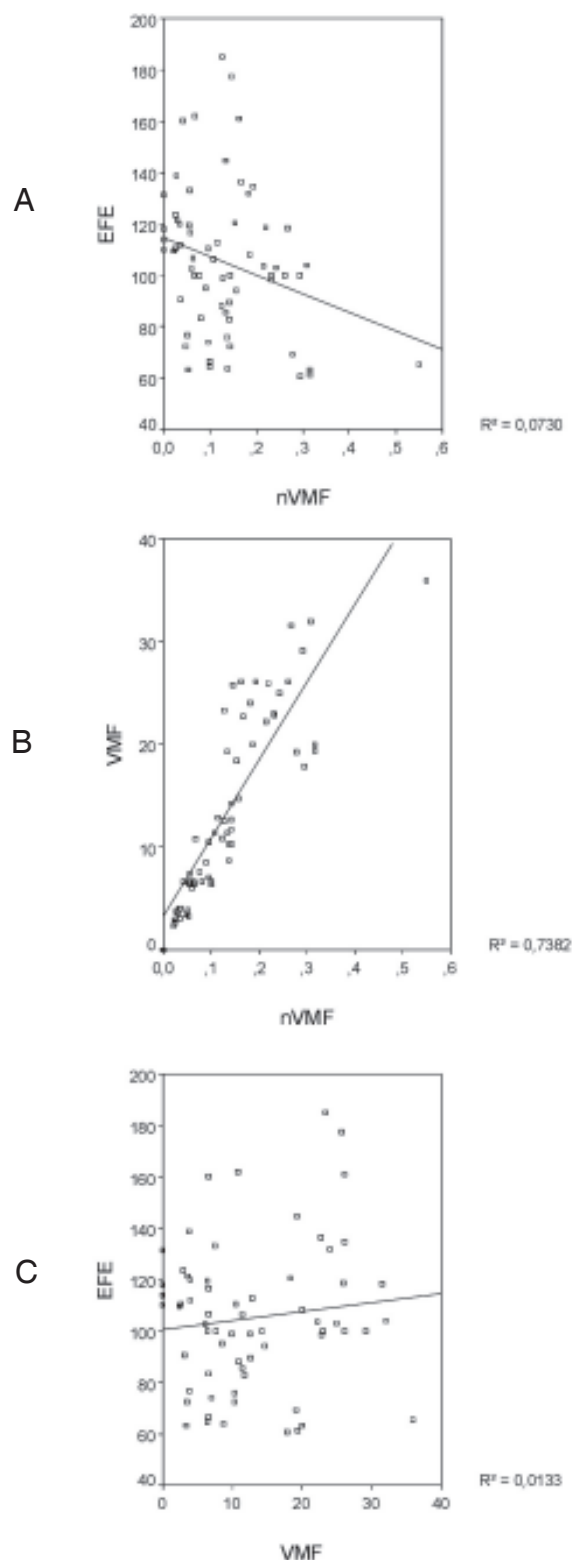


Figura 1. Relaciones entre la nVMF, la VMF y el EFE de las mujeres embarazadas incluidas en el estudio. VMFn: vasodilatación mediada por flujo normalizada, VMF: vasodilatación mediada por flujo, EFE: estrés de fricción endotelial.

Discusión

El objetivo del estudio fue presentar la primera exploración de la normalización de los datos de la VMF durante la gestación y examinar la relación del EFE y la nVMF en esta población. La VMF es una medida fisiológica validada en diferentes estados fisiológicos, y su objetivo es estimar de manera no invasiva la función endotelial (1, 5, 8). También, se la asocia con algunos factores de riesgo cardiovascular y con eventos cardiovasculares (29). Ésta sigue siendo una herramienta utilizada en investigación y es poco probable que pueda convertirse en una herramienta clínica debido a su variabilidad (8), y a su relación con factores técnicos y biológicos. A pesar de que existen recomendaciones y guías clínicas para su uso (8), los investigadores siguen utilizando métodos variados (29). En este documento se propone la utilización de la normalización de la VMF mediante el postulado Ley de Poiseuille para el cálculo la magnitud del EFE y así eliminar algunos de los factores biológicos que contribuyen a la variabilidad de la VMF. Es claro que el uso de la Ley Poiseuille no eliminaría la contribución de los factores biológicos y la variabilidad de este biomarcador; sin embargo, este es un gran paso en la dirección correcta y debe fomentarse, aunque teniendo prudencia de no invalidar los estudios previos con VMF como medida de la función endotelial.

En este contexto, se ha demostrado que la respuesta de la VMF constituye un predictor del riesgo cardiovascular y eventos futuros (30), mientras que la utilidad clínica de la nVMF no se ha establecido con claridad. Desde un punto de vista teórico y fisiológico, la normalización de la VMF, independientemente del estímulo del cálculo del EFE, proporciona un método más completo de la evaluación de la función del endotelio, reduciendo la variabilidad asociada con la reactividad arterial periférica. No obstante, la mención de respuesta del EFE (mediante el cálculo estándar de velocidad del flujo vascular con respecto a la Ley de Poiseuille) podría dar una idea de la magnitud del estímulo, así como información sobre la función microvascular y el potencial riesgo cardiovascular a futuro.

Conclusiones

En la actualidad es posible evaluar la función endotelial a través de la medición de la dilatación vascular dependiente del endotelio o VMF, mediante ultrasonografía de alta resolución de la arteria braquial, una metodología simple, reproducible y no invasiva. A través de este

método, se ha determinado la función endotelial en distintos grupos poblacionales y se ha evaluado el impacto de intervenciones farmacológicas y no farmacológicas. Este estudio muestra la primera exploración de la normalización de la VMF durante la gestación y examina la relación del EFE y la nVMF en esta población.

Los hallazgos encontrados en este trabajo demuestran la relación entre la VMF y el EFE, utilizando esta metodología. La normalización de la VMF, adicionará a la clásica medida de la función endotelial, los cambios que pueden asociarse con la adaptación vascular al embarazo, tal como lo reportan otros autores.

Sin embargo, futuras investigaciones cuidadosamente diseñadas podrían estudiar esta propuesta en otras poblaciones con mayor tamaño de muestra. También se debería alentar para que la nVMF alguna vez pueda ser considerada como una herramienta clínica para evaluar el riesgo cardiovascular y algunas de las complicaciones propias del embarazo, tales como pre-eclampsia, hipertensión y diabetes gestacional.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones y al Laboratorio de Proteínas y Enzimas de la Universidad del Valle por la financiación del proyecto. A COLCIENCIAS por el soporte que brindó a Robinson Ramírez-Vélez, dentro del programa de Doctorados Nacionales del Instituto para el Desarrollo de Ciencia y Tecnología de Colombia. Y muy especialmente a las participantes de esta investigación.

Bibliografía

1. 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: 1111-1115.
2. Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002; 106: 640-642.
3. Patel AR, Kuvin JT, Sliney KA, Rand WM, Chiang JC, Udelsom JE, et al. Gender-based differences in brachial artery flow-mediated vasodilation as an indicator of significant coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2005; 96: 1223-1226.
4. Chequer G, Nascimento BR, Navarro TP, Falqueto EB, Alencar MCN, Miranda MCR, et al. Espessamento médio-intimal da carótida e função endotelial na doença arterial coronariana. *Arq Bras Cardiol*. 2006; 87: 84-90.
5. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. 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: 257-265.
6. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007; 115: 2390-2397.
7. Shimbo D, Grahame-Clarke C, Miyake Y, Rodriguez C, Sciacca R, Di TM, et al. The association between endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in a population-based multi-ethnic cohort. *Atherosclerosis* 2007; 192: 197-203.

8. Padilla J, Johnson BD, Newcomer SC, Wilhite DP, Mickleborough TD, Fly AD, et al. Normalization of flow-mediated dilation to shear stress area under the curve eliminates the impact of variable hyperemic stimulus. *Cardiovasc Ultrasound*. 2008; 6: 44.
9. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Stone PH, Feldman CL. Risk stratification of individual coronary lesions using local endothelial shear stress: a new paradigm for managing coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. 2007; 22: 552-564.
10. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 25: 2379-93.
11. Wolin MS, Rodenburg JM, Messina EJ, Kaley G. Similarities in the pharmacological modulation of reactive hyperemia and vasodilation to hydrogen peroxide in rat skeletal muscle arterioles: effects of probes for endothelium-derived mediators. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990; 253: 508-512.
12. Pyke KE, Tschakovsky ME. Peak vs. total reactive hyperemia: which determines the magnitude of flow-mediated dilation? *J Appl Physiol*. 2007; 102: 1510-1519.
13. Lind L, Hall J, Johansson K. Evaluation of four different methods to measure endothelium-dependent vasodilation in the human peripheral circulation. *Clin Sci*. 2002; 102: 561-567.
14. Huang AL, Silver AE, Shvenke E, Schopfer DW, Jahangir E, Titas MA, et al. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 2113-2119.
15. Pyke KE, Dwyer EM, Tschakovsky ME. Impact of controlling shear rate on flow-mediated dilation responses in the brachial artery of humans. *J Appl Physiol*. 2004; 97: 499-508.
16. López-Jaramillo P, Terán E, Moncada S. Calcium supplementation prevent pregnancy-induced hypertension by increasing the production of vascular nitric oxide. *Med Hypoth*. 1995; 45: 68-72.
17. López-Jaramillo P, Narváez M, Calle A, Rivera J, Jácome P, Ruano C, et al. Cyclic guanosine 3', 5' monophosphate concentrations in preeclampsia: effects of hydralazine. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996; 103: 33-38.
18. López-Jaramillo P, Arenas WD, García RG, Rincón MY, López M. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Therap Adv Cardiovas Dis*. 2008; 2: 261-275.
19. Terán E, Escudero C, Moya W, Flórez M, Vallance P, López-Jaramillo P. Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in andean women with preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2001; 75: 243-249.
20. Palm M, Axelsson O, Wernroth L, Basu S. F(2)-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy. *Free Radic Res*. 2009; 43: 546-52.
21. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 7: 609-613.
22. Walsh SK, English FA, Johns EJ, Kenny LC. Plasma-mediated vascular dysfunction in the reduced uterine perfusion pressure model of preeclampsia: a microvascular characterization. *Hypertension*. 2009; 54: 345-51.
23. López-Jaramillo P. Prevention of preeclampsia with calcium supplementation and its relation with the L-arginine: nitric oxide pathway. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 29: 731-743.
24. Cockell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension*. 1997; 30: 247-51.
25. Knock GA, McCarthy AL, Lowy C, Poston L. Association of gestational diabetes with abnormal maternal vascular endothelial function. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997; 104: 229-34.
26. ACOG Committee Opinion No. 267. Exercise during pregnancy and the postpartum period American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstetrics and Gynecology* 2002; 99: 171-3.
27. Accini L, Sotomayor A, Trujillo F, Barrera JG, Bautista L, López-Jaramillo P. Colombian Study to Assess the Use of Noninvasive Determination of Endothelium-Mediated Vasodilatation (CANDEV). Normal Values and Factors Associated. *Endothelium* 2001; 8: 157-166.
27. Silva S, Villamizar C, Villamizar N, Silva F, Luengas C, Casas JP, et al. Colombian study to assess the use of noninvasive determination of Endothelium-mediated vasodilation (CANDEV). II. Does location of the occlusion device affects Diagnostic accuracy? *Endothelium* 2005; 12: 107-111.
28. Juonala M, Viikari JSA, Laitinen T, Marneim J, Helenius H, Ronnema T, et al. Interrelations between branchial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Circulation* 2004; 110: 2918-2923.
29. Brevetti G, Silvestro A, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. *Circulation* 2003; 108: 2093-2098.
30. Reneman RS, Art T, Hoeks APG. Wall shear stress—an important determinant of endothelial cell function, and structure in the arterial system in vivo. *J Vasc Res*. 2006; 43: 251-269.
31. Soljanlahti S, Autti T, Hyttinen L, Vuorio AF, Keto P, Lauerman K. Compliance of the aorta in two diseases affecting vascular elasticity. Familial hypercholesterolemia and diabetes: an MRI study. *Vas Health Risk Manag*. 2008; 4: 1103-1109.
32. Savvidou MD, Kametas NA, Donald AE, Nicolaides KH. Non invasive assessment of endothelial function in normal pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 15: 502-507.
33. Dorup I Skojaa K, Sorensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol* 1999; 276 (3 Pt 2): H821-H825.