

Fenómenos oxidativos en la fisiopatología vascular

J M. Galcerán Gui y A. Martínez Amenós

Unidad de Hipertensión Arterial. Servicio de Nefrología.
Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona

Ignorados hasta hace menos de veinte años, los radicales libres de oxígeno se encuentran ahora en el ojo del huracán. Parece como si no hubiera proceso biológico en el que de alguna manera no se hallaran implicados. La hipótesis oxidativa de la arteriosclerosis se ha ido consolidando y hoy se acepta que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad es un fenómeno crucial en el inicio de la placa arteriosclerótica. La disfunción endotelial parece mediada en gran parte por una de las principales especies reactivas del oxígeno, el anión superóxido, y actualmente los radicales libres de oxígeno se implican también en la fisiopatología de la hipertensión arterial. Despues de amplios estudios epidemiológicos sugiriendo el papel beneficioso de los antioxidantes en la prevención de eventos cardiovasculares, algunos estudios de intervención parecen confirmar dichas hipótesis. Este artículo pretende exponer comprensiblemente qué son los radicales libres de oxígeno, cuál es su papel en la disfunción endotelial, hipertensión arterial y arterioesclerosis, y repasar los principales estudios epidemiológicos y de intervención antioxidante realizados hasta el momento.

Hace escasamente 45 años, el doctor Denham Harman hipotetizaba que *el envejecimiento está causado por reacciones de radicales libres que se generan en el ambiente, en las enfermedades y en reacciones intrínsecas inherentes al proceso de envejecimiento*. La comunidad científica en su mayoría rechazó sus teorías, unas moléculas tan agresivas no podían estar presentes en el sistema biológico humano. Quince años más tarde, en 1969, McCord y Fridovich descubren que la función de una proteína aislada previamente en los hematíes es combinar dos moléculas de superóxido para formar una molécula de hidroperóxido y una de oxígeno¹. Denominaron a dicha proteína superóxido dismutasa (SOD). Si las células poseían la enzima debían poseer también el sustrato. Desde entonces, el interés en los radicales libres ha crecido de forma exponencial y actualmente se implican en la fisiopatología de numerosas enfermedades como diabetes, Alzheimer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), artritis, cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Radicales libres de oxígeno. Qué son, cómo se forman, cómo actúan, cómo nos defendemos de ellos

Los radicales libres son moléculas con electrones desapareados en sus orbitales. Esta característica las hace inestables, más dispuestas a reaccionar con otras moléculas. Los radicales más importantes biológicamente son los radicales de oxígeno, que se forman durante la reducción incompleta de oxígeno a agua. No todas

las especies reactivas derivadas del oxígeno son radicales, aunque el nombre de radicales libres de oxígeno (RLO) se ha popularizado y las engloba como grupo. Los auténticos radicales se indican con un punto. Los principales RLO son el anión superóxido (O_2^-), el hidroperóxido (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot). Otros RLO de gran importancia biológica son el óxido nítrico (NO^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). Las principales fuentes celulares de O_2^- son la cadena respiratoria mitocondrial, la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la citocromo P₄₅₀ oxidasa y la ciclooxigenasa. El O_2^- pasa a H_2O_2 por acción de la SOD y éste a HO^\cdot si hay metales pesados que cedan electrones. HO^\cdot es el radical más reactivo y agresivo. O_2^- puede también reaccionar con otras moléculas como el NO^\cdot para formar $ONOO^-$, que sin ser un radical es un oxidante potente, capaz de inducir peroxidación lipídica (fig. 1). Los RLO atacan el ADN, los carbohidratos, las proteínas y sobre todo los lípidos. El organismo se defiende de ellos con sistemas antioxidantes. Estos sistemas son enzimáticos (SOD, catalasa, glutatión peroxidasa/glutatión reductasa) y no enzimáticos (vitamina E o alfatoferol, vitamina C o ácido ascórbico, betacaroteno, ácido úrico y glutatión).

Alteraciones vasculares funcionales: disfunción endotelial

El endotelio regula la función y la estructura vascular mediante la secreción de factores vasoconstrictores-proliferativos (angiotensina II, endotelina, tromboxano, O_2^-) y factores vasodilatadores-antiproliferativos (prostaciclina, factor hiperpolarizan-

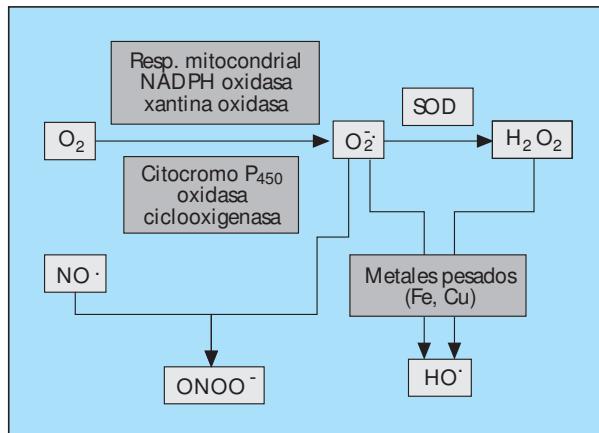


Fig. 1. Vías de formación de las especies reactivas del oxígeno. SOD: superóxido dismutasa.

te, NO[·]). En la disfunción endotelial se altera el equilibrio entre ellos, favoreciéndose los vasoconstrictores, y es el paso previo a la formación de alteraciones estructurales. Uno de los principales efectos del O₂[·] es neutralizar el NO[·], impidiendo así su función vasodilatadora y antiproliferativa. Más aún, el ONOO[·] resultante puede peroxidar los lípidos de membrana.

La hipercolesterolemia induce disfunción endotelial² y también un aumento de la síntesis de O₂[·]³. Inhibidores de la xantina oxidasa como el oxipurinol bloquean la producción de O₂[·] y revierten la disfunción endotelial tanto en modelos experimentales³ como en humanos⁴, sugiriendo de este modo que los RLO son responsables de esta disfunción. Los estudios con vitaminas antioxidantes arrojan resultados contradictorios: un mes de tratamiento combinado con vitaminas E y C no redujo la disfunción endotelial en adultos hipercolesterolémicos⁵, pero un mes y medio del mismo tratamiento sí lo hizo en niños con dislipidemia familiar⁶. Podría especularse que en estos últimos todavía no se habrían producido alteraciones estructurales. Sin embargo, la infusión directa de vitamina C sí corrige la disfunción endotelial en adultos dislipidémicos⁷ al igual que lo hace en pacientes con angina espástica⁸. La hipertensión causada por angiotensina II, y no por norepinefrina, induce la síntesis de O₂[·]⁹. Sólo la hipertensión acompañada de estrés oxidativo causa disfunción endotelial, que se corrige con SOD⁹. Asimismo, al igual que en la hipercolesterolemia, la infusión de vitamina C restaura la vasodilatación endoteliodependiente en pacientes con hipertensión arterial (HTA) esencial¹⁰. El oxipurinol, que sí corrige la disfunción endotelial en pacientes dislipidémicos, no lo hace en hipertensos⁴, sugiriendo que el sistema xantina oxidasa es importante en la hipercolesterolemia pero no en la HTA.

La diabetes también induce disfunción endotelial que parece estar mediada por una disminución de la biodisponibilidad de NO[·]¹¹. El tratamiento con SOD o con dimetil-thiourea, un quelante de HO[·], normaliza la disfunción endotelial en diabetes experimental¹², al igual que lo hace N-acetil-cisteína, un precursor del glutatión¹³. De nuevo, la infusión de vitamina C mejora la disfunción endotelial en pacientes diabéticos¹⁴.

Alteraciones vasculares estructurales

Los RLO participan de dos maneras distintas en la hipertrofia vascular. En primer lugar como inductores directos de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial^{15, 16} o el factor nuclear kappa-B¹⁷.

En segundo lugar, y más importante, como mediadores de la respuesta celular a factores troficos y vasoactivos como el ácido araquidónico¹⁸, angiotensina II^{19, 20} o la endotelina²¹. El bloqueo de la síntesis de RLO inhibe los efectos hipertróficos y proliferativos de estos factores¹⁸⁻²⁰. El mecanismo por el cual los RLO inducen hipertrofia no está completamente dilucidado, pero implica la estimulación de la protein cinasa C y de diferentes tirosin kinasas que en la última instancia estimulan factores de transcripción proteica como el factor nuclear kappa B y genes codificadores de proteínas como c-fos y c-jun^{22, 23}.

La formación de la placa arteriosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los monocitos/macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia. La oxidación del colesterol LDL (oxLDL) es un fenómeno capital en este proceso²⁴ (fig. 2).

La oxLDL es más aterogénica que LDL por cuatro motivos:

- 1) Es captada más ávidamente por los macrófagos. La incubación de macrófagos con LDL no produce células espumosas, pues los crecientes niveles intracelulares de colesterol inhiben la expresión del receptor LDL. Contrariamente, la oxLDL es captada por otros receptores que no responden a los niveles de colesterol intracelular²⁵.
- 2) La oxLDL es una potente estimuladora de las moléculas de adhesión E-selectina, intracelular 1 (ICAM-1) y celular vascular 1 (VCAM-1), todas ellas responsables de la adhesión de leucocitos al endotelio²⁶.
- 3) Es citotóxica para las células endoteliales²⁷.

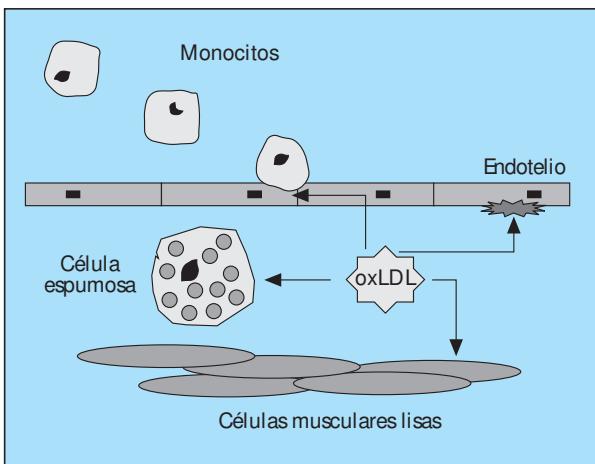


Fig. 2. Mecanismos aterogénicos de las LDL oxidadas: 1) formación de células espumosas; 2) inducción de moléculas de adhesión; 3) citotoxicidad endotelial, y 4) proliferación de células musculares lisas. LDL: lipoproteínas de baja densidad.

4) Estimula la proliferación de células musculares lisas de la vasculatura²⁸.

Una dieta aterogénica con ácidos grasos saturados modifica la composición de las LDL y aumenta su sensibilidad para oxidarse²⁹, favoreciendo así el proceso arteriosclerótico. Por otra parte, uno de los posibles mecanismos antiaterogénicos de las HDL podría ser su capacidad para inhibir la oxidación de las LDL³⁰.

Evidencias de la participación de los fenómenos oxidativos en la HTA y la arteriosclerosis

La HTA inducida por angiotensina II, que ya hemos comentado que se acompaña de una síntesis aumentada de O_2^- , puede corregirse con SOD liposomada³¹. En modelos genéticos como la rata espontáneamente hipertensa (SHR), la administración de temporal, un análogo liposoluble de la SOD, también disminuye la presión arterial³². Otros antioxidantes como aminotriazol, ácido ascórbico y glutatión también disminuyen la TA en SHR³³. Por último, en modelos de HTA sal-sensible se han detectado altos niveles tisulares de O_2^- y niveles plasmáticos elevados de H_2O_2 que se correlacionan con la tensión arterial (TA) media³⁴.

En la HTA humana aumentan los marcadores de estrés oxidativo tales como el ácido tiobarbitúrico³⁵, el malondialdehido e immunoglobulinas anti-LDL oxidada³⁶. Asimismo también disminuye la capacidad de defensa antioxidante³⁷. Un amplio estudio en el Reino Unido ha detectado que los niveles plasmáticos de vitamina C se correlacionan inversamente con la TA y con la frecuencia cardíaca³⁸.

En arteriosclerosis se detecta la presencia de LDL oxidada en las placas de ateroma, y sus niveles se correlacionan con la progresión de las lesiones^{39, 40}. En conejos hipercolesterolémicos los niveles de malondialdehido se correlacionan mejor con el grado de ateromatosis que el mismo colesterol⁴¹; y sustancias tan diversas como hipolipidemiantes (lovastatina), antioxidantes (vitamina E) e hipotensores (amlodipino) podrían ejercer su efecto protector, no a través de la corrección de la dislipidemia, sino por la estimulación de las defensas antioxidantes y la disminución de la peroxidación lipídica⁴¹. Los polifenoles del vino tinto, con propiedades antioxidantes, reducen los niveles de malondialdehido y atenúan el desarrollo de placas arterioscleróticas⁴². Finalmente, en otras patologías análogas como la nefroangioesclerosis, la vitamina E mejora la proteinuria y el grado de lesión estructural⁴³.

Estudios epidemiológicos

Los principales estudios epidemiológicos acerca del efecto de las vitaminas antioxidantes sobre las enfermedades cardiovasculares han sido recientemente revisados por Lonn y Yusuf⁴⁴. Dos estudios de la Universidad de Harvard, comprendiendo un total de unos 130.000 profesionales sanitarios, encontraron que aquellos que tomaban suplementos diarios de vitamina E tenían hasta un 35 % menos de eventos coronarios que aquellos que no los tomaban^{45, 46}. En otro estudio de más de 11.000 individuos mayores de 65 años, los suplementos de vitamina E disminuyeron la mortalidad total en un 27 % y la mortalidad cardiovascular en un 41 %⁴⁷. Resultados parecidos se observaron en un estudio de 34.486 mujeres postmenopáusicas en Estados Unidos⁴⁸ y en más de 5.000 finlandeses⁴⁹; en estos dos últimos estudios la vitamina E de la dieta parecía tener mejor efecto protector que los suplementos.

Las observaciones con los betacarotenos no son tan consistentes como con vitamina E⁴⁴, aunque un artículo observacional prospectivo publicado recientemente encuentra una reducción muy significativa de infartos de miocardio en aquellos individuos con mayor ingesta de betacarotenos y no significativa con vitamina E⁵⁰.

Respecto a vitamina C, la mayoría de los estudios epidemiológicos no han podido demostrar beneficios después de ajustar otros factores de riesgo e ingesta de otras vitaminas antioxidantes⁴⁴.

Ensayos clínicos randomizados

Dos estudios de casi 30.000 pacientes cada uno no pudieron demostrar una disminución

significativa de eventos cardiovasculares con suplementos vitamínicos antioxidantes^{51, 52} quizá porque la dosis de vitamina E era excesivamente baja.

El estudio más prometedor es el *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS), en el que 2.000 pacientes con coronariopatía probada angiográficamente recibieron dosis más elevadas de vitamina E (400-800 UI) y presentaron una importantísima reducción de accidentes cardiovasculares (hasta un 75 % menos) en un tiempo inusualmente corto de tratamiento (1,5 años)⁵³. En otro estudio, la ingesta de dosis bajas de vitamina E (10 UI/d) durante dos años se asoció con una reducción de las lesiones coronarias por angiografía en hombres con hipercolesterolemia moderada⁵⁴, y en un pequeño grupo de 100 pacientes que se sometieron a angioplastia disminuyó un 46 % el riesgo de estenosis en los que tomaron dosis muy elevadas de vitamina E (1.200 UI/d)⁵⁵.

Un pequeño estudio defiende en solitario, de momento, la eficacia de los suplementos vitamínicos para reducir la presión arterial en clínica humana: Galley et al han observado que una terapia combinada con vitamina E, vitamina C, betacaroteno y zinc disminuye la TA y aumenta la excreción urinaria de nitritos⁵⁶.

¿Qué nos depara el futuro? Por lo menos esperanza, o HOPE—en inglés—, siglas que corresponden a *Heart Outcomes Prevention Evaluation*; un estudio randomizado internacional de más de 9.000 pacientes que investigará los efectos de ramipril y vitamina E, juntos y por separado, en la prevención de infartos de miocardio, muerte cardiovascular y accidentes vasculares cerebrales⁵⁷.

Un interesante y distinto abordaje de unos problemas clásicos está en marcha.

Bibliografía

- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6.049-6.055.
- Gilligan DM, Guetta V, Panza JA, García CE, Quyyumi AA, Cannon RO. Selective loss of microvascular endothelial function in human hypercholesterolemia. *Circulation* 1994; 90:35-41.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91:2.546-2.551.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 30:57-63.
- Gilligan DM, Sack MN, Guetta V, et al. Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1.611-1.617.
- Mietus-Snyder M, Malloy MJ. Endothelial dysfunction occurs in children with two genetic hyperlipidemias: improvement with antioxidant vitamin therapy. *J Pediatr* 1998; 133:35-40.
- Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Vitamina C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95:2.617-2.622.
- Kugiyama K, Motoyama T, Hirashima O, et al. Vitamin C attenuates abnormal vasoconstrictor reactivity in spasm coronary arteries in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:103-109.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasoconstrictor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1.916-1.923.
- Taddei S, Virdis A, Giudoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation* 1998; 97:2.222-2.229.
- Cosentino F, Luscher TJ. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32(suppl 3): S54-S61.
- Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol* 1994; 266(3 Pt 2): H1.153-1.161.
- Pieper GM, Siebeneich W. Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:101-105.
- Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamina C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97:22-28.
- Kuroki M, Voest EE, Amano S, et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 1996; 98:1.667-1.675.
- Ruef J, Hu ZY, Yin LY, et al. Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ Res* 1997; 81:24-33.
- García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1995; 48:825-834.
- Nishio E, Watanabe Y. The involvement of reactive oxygen species and arachidonic acid in alpha 1-adrenoceptor-induced smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 1997; 121:665-670.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:1.141-1.148.
- James EA, Galceran JM, Raji L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 1998; 54:775-784.
- Kasemsri T, Armstead WM. Endothelium production links superoxide generation to altered opioid-induced pial artery vasodilatation after brain injury in pigs. *Stroke* 1997; 28:190-196.
- Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H_2O_2 and O_2^- in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; 77:29-36.
- Puri PL, Avantaggiati ML, Burgio VL, et al. Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-jun. C-fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells. *J Biol Chem* 1995; 270:22.129-22.134.
- Alexander RE. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 1995; 25:155-161.
- Steinberg D, Parathasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoproteins. *Science* 1991; 252:1483-1486.

- protein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924.
26. Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A, et al. Lacidipine inhibits the activation of the transcription factor NF-kappa B and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on endothelial cells. *J Hypertens* 1997; 15 (12 pt 2):1.633-1.640.
 27. Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM, Chisolm GM. Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats *in vivo*. *Circ Res* 1997; 78:0:37-44.
 28. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, et al. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 96:2.322-2.330.
 29. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemia subjects. *J Clin Invest* 1993; 91:668-676.
 30. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995; 115:243-253.
 31. Laursen B, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 95:588-593.
 32. Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension* 1998; 32:59-64.
 33. Akpaffiong MJ, Taylor AA. Antihypertensive and vasodilator actions of antioxidants in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11:1.450-1.460.
 34. Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 1997; 30:1.628-1.633.
 35. Park T, Allikmets K, Teesalu R, Zilmer M. Oxidative stress and hyperinsulinaemia in essential hypertension: different facets of increased risk. *J Hypertens* 1996; 14:407-410.
 36. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Martignoni A, Finardi G, Bellomo G. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced *in vivo* low-density lipoprotein oxidation. *J Hypertens* 1995; 13:129-138.
 37. Jin T, Ke-yan F, Catalano M. Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hum Hypertens* 1996; 10: 305-309.
 38. Bates CJ, Walmsley CM, Prentice A, Finch S. Does vitamin C reduce blood pressure? Results of a large study of people aged 65 or older. *J Hypertens* 1998; 16:925-932.
 39. Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 415-422.
 40. Craig WY, Rawstron MW, Rundell CA, et al. Relationship between lipoprotein—an oxidation—related variables and atheroma lipid composition in subjects undergoing coronary artery *by-pass* graft surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1.512-1.517.
 41. Chem L, Haught WH, Yang B, Saldeen TG, Parthasarathy S, Mehta JL. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:569-575.
 42. Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerotic in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 142:139-149.
 43. Atarashi K, Ishiyama A, Takagi M, et al. Vitamin E ameliorates the renal injury of Dahl salt-sensitive rats. *Am J Hypertens* 1997; 10 (5 Pt 2):116S-119S.
 44. Lonn EM, Yusuf S. Emerging approaches in the prevention of atherosclerosis cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract Suppl* 1998; 94:7-19.
 45. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328:1.450-1.456.
 46. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1.444-1.449.
 47. Losonczi KG, Harris TB, Havlik RJ. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:190-196.
 48. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334:1.156-1.162.
 49. Knekt P, Reunanan A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol* 1994; 139:1.180-1.189.
 50. Klipstein-Grobusch K, Geleijnse JM, den Breejen JH, et al. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:261-266.
 51. Rapola JM, Virtamo J, Haukka JK, et al. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of angina pectoris. A randomized double-blind, controlled trial. *JAMA* 1996; 275:693-698.
 52. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamins/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1.483-1.492.
 53. Stephens NG, Parsons A, Schofields PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study. *Lancet* 1996; 347:781-786.
 54. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA* 1995; 273:1.849-1.854.
 55. DeMaio SJ, King SB, Lembo NJ, et al. Vitamin E supplementation, plasma lipids and incidence of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). *J Am Coll Nutr* 1992; 11:68-73.
 56. Galley HF, Thornton J, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Combination oral antioxidant supplementation reduces blood pressure. *Clin Sci (Colch)* 1997; 92:361-365.
 57. The HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) Study: the design of a large, simple randomized trial of an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ramipril) and vitamin E in patients at high risk of cardiovascular events. The HOPE study investigators. *Can J Cardiol* 1996; 12:127-137.