

Hipótese Oxidativa da Aterosclerose e Emprego dos Antioxidantes na Doença Arterial Coronária

Michel Batlouni

São Paulo, SP

Está atualmente bem estabelecido que níveis plasmáticos elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL) constituem fator de risco capital para o desenvolvimento da aterosclerose. Entretanto, em qualquer concentração plasmática de LDL, há grande diversidade na magnitude da aterosclerose e na expressão clínica da cardiopatia isquêmica ou doença arterial coronária (DAC). Tais diferenças têm sido atribuídas a fatores que vão “além do colesterol”¹. Um desses fatores é a base da chamada hipótese oxidativa da aterosclerose, que postula ser a modificação oxidativa da LDL importante e, possivelmente, obrigatória na patogênese da doença²⁻⁶.

A LDL é um complexo de lípidos polares e neutros, uma proteína de grande peso molecular, a apolipoproteína B, e antioxidantes lipofílicos, principalmente alfa-tocoferol e beta-caroteno. Em cultura, todas as células da parede arterial podem iniciar a oxidação da LDL, porém, a importância relativa das células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos nessa modificação, *in vivo*, não está ainda suficientemente esclarecida. Admite-se que a liberação do ânion superóxido pelas células endoteliais e musculares lisas, no processo de formação de endoperóxidos cíclicos e prostaglandinas, pela via da ciclo-oxigenase, pode ser responsável pelo início da oxidação em algumas condições, enquanto a atividade aumentada da lipoxigenase em macrófagos poderia gerar aumento de hidroperóxidos lipídicos^{7,8}. A participação da lipoxigenase no processo de peroxidação lipídica na parede arterial, envolvendo a geração de hidroperóxidos lipídicos intermediários, está bem estabelecida⁹. Nesse contexto, há evidências de que a modificação oxidativa induzida pelas células endoteliais e musculares lisas e macrófagos é processo mediado por radicais livres de oxigênio, catalisado pela presença de metais de transição, como ferro e cobre^{10,11}, ou pela ceruloplasmina, que atua como pró-oxidante¹².

No plasma, a oxidação de LDL é provavelmente mínima, devido à presença de muitos antioxidantes e à capacidade removedora das células sinusoidais hepáticas, que contêm receptores em abundância⁶. A modificação oxidativa ocorreria primariamente na íntima arterial.

Presume-se que a peroxidação lipídica se inicie nos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos da superfície

de LDL e, a seguir, se propague aos lípidos do núcleo (*core*), resultando em modificação oxidativa tanto dos ácidos graxos poliinsaturados, como do colesterol e fosfolípidos e, finalmente, modificação e degradação da apo B^{4,5}.

LDL - oxidadas e aterogênese

As lipoproteínas atravessam as células endoteliais intactas por transporte vesicular (transcitose), o qual não requer receptores. A magnitude desse transporte é concentração-dependente; níveis elevados de LDL resultam em aumento da quantidade do composto que atinge a íntima, através de endotélio intacto. Para qualquer nível de concentração plasmática de lipoproteína, sua retenção na parede arterial é mais importante do que a taxa de transporte na parede arterial^{13,14}. Na íntima, essas LDL são aprisionadas numa trama de fibras e fibrilas secretadas pelas células parietais¹⁵. LDL nativas são reconhecidas e não se acumulam em quantidade apreciável nos macrófagos. A partícula deve ser modificada para que seja captada em quantidade suficiente para gerar células espumosas. As células endoteliais e musculares lisas, e também os macrófagos, secretam produtos oxidativos por múltiplas vias, os quais difundem as LDL aprisionadas no espaço subendotelial e iniciam a oxidação lipídica.

A modificação oxidativa da LDL parece ocorrer em dois estágios¹⁶ (fig. 1). O 1º, antes que os monócitos sejam ativados, resulta na oxidação dos lípidos da LDL, com pequena alteração na apo B (LDL minimamente oxidada - MM-LDL-OX). O 2º começa quando os monócitos são ativados e convertidos em macrófagos, que contribuem com sua grande capacidade oxidativa. Nesse estágio, os lípidos da LDL são adicionalmente oxidados e a fração protéica (apo B) também o é. Essas LDL altamente oxidadas (LDL-OX) deixam de ser reconhecidas pelos receptores clássicos de LDL, porém são reconhecidas pelos receptores de LDL acetilados (removedores) e/ou receptores oxidados^{17,18}, que não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol. Em consequência, ocorre acúmulo maciço de colesterol, formando-se as células espumosas, que são a marca característica das estrias gordurosas.

A modificação oxidativa da LDL, além de induzir à captação aumentada pelos macrófagos, produz muitas moléculas modificadas, com efeitos biológicos diversos, inclusive efeito acentuado na injúria endotelial e na ativação de células endoteliais^{5,19}. MM-LDL-OX induzem à produção, pelas células endoteliais, de potentes ativadores dos monócitos, como a proteína quimiotática para monócitos

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - São Paulo
Correspondência: Michel Batlouni - Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 - 04012-180 - São Paulo, SP
Recebido para publicação em 9/10/96
Aceito em 16/11/96

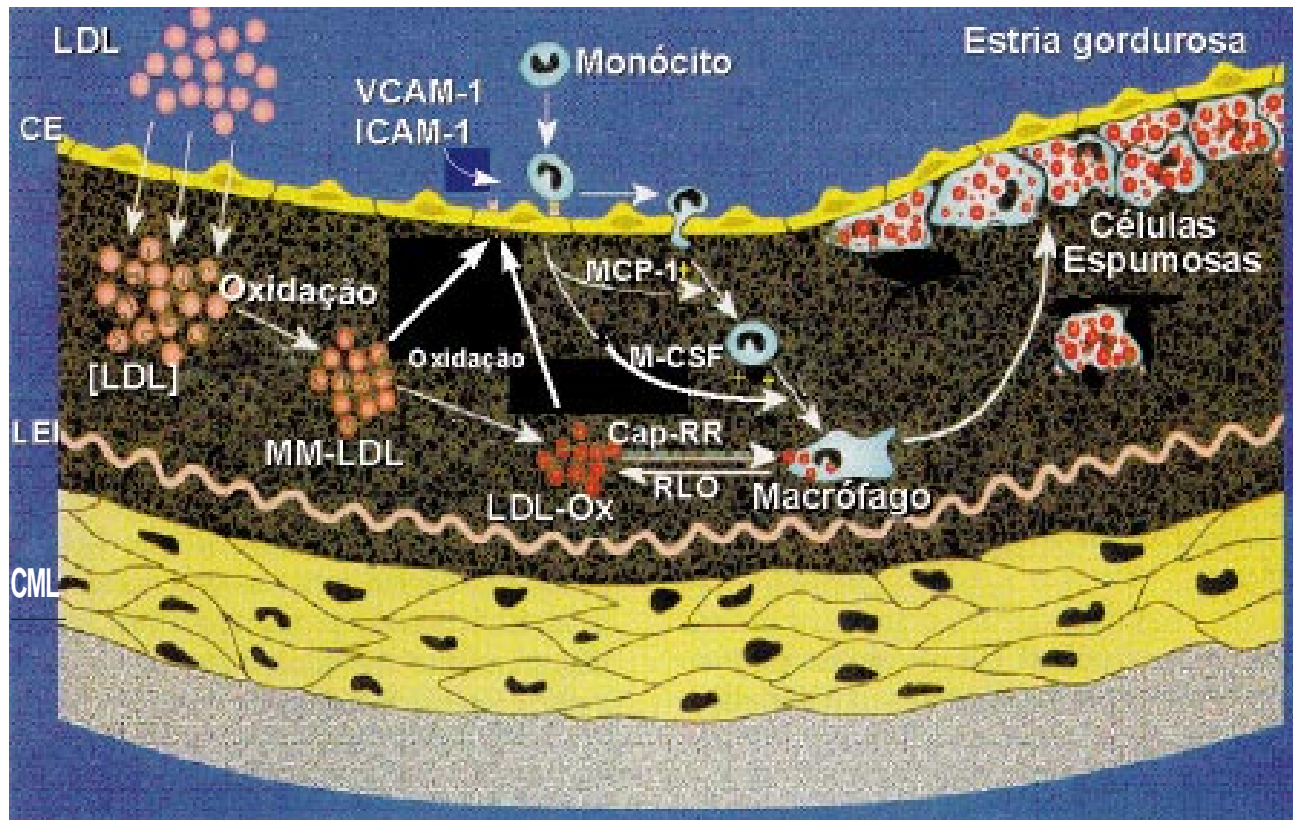


Fig. 1 - Representação esquemática da hipótese oxidativa e do papel das LDL-oxidadas no processo aterogênico. CE- célula endotelial; LEI- lâmina elástica interna; CML- célula muscular lisa; MM-LDL- LDL minimamente oxidada; LDL-OX- LDL oxidada; VCAM-1- molécula de adesão das células vasculares; ICAM-1- molécula de adesão da célula intracelular; MCP-1- proteína quimiotática para monócitos (entrada na íntima); M-CSF- fator estimulador das colônias de monócitos (diferenciação); Cap-RR- captação pelos receptores removedores dos macrófagos; RLD- radicais livres de oxigênio. Apud Berliner et al¹⁶

(MCP-1)²⁰, o fator estimulador das colônias de monócitos (M-CSF)²¹ e a GRO-KC²², os quais estimulam o crescimento e a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Portanto, LDL-oxidadas, além de transformarem macrófagos em células espumosas, aumentam a adesão, ativação e migração dos monócitos^{3,20} (fig. 2).

LDL-OX estimulam a secreção pelos monócitos da interleucina-1 (IL-1), fator de crescimento para células musculares lisas²³. Uma das características peculiares das LDL-OX é o aumento acentuado de seu conteúdo de lisofosfatidilcolina. Essa substância é quimiotática para monócitos²⁴ e linfócitos T²⁵, inibe o relaxamento dependente do endotélio e induz à expressão da molécula de adesão das células vasculares (VCAM-1) e da molécula de adesão intracelular (ICAM-1) nas células endoteliais²⁶. Ademais, a lisofosfatidilcolina provoca aumento dos níveis do fator de crescimento epidermal ligado à heparina (HB-EGF) nas células endoteliais²⁷.

LDL altamente oxidadas podem também inibir a migração de células endoteliais e comprometer a reparação de placas ulceradas em lesões ateroscleróticas avançadas²⁸. Demonstrou-se ainda que LDL-OX são tóxicas para macrófagos e, como consequência, podem contribuir à amplificação do processo inflamatório e à formação do núcleo necrótico encontrado nas lesões avançadas. LDL-OX são também imunogênicas; anticorpos a determinados epítopos (deter-

minantes antigênicos) de LDL-OX são encontrados no plasma e em lesões associadas a imuno-complexos. Assim, pois, há tanto uma resposta humoral como imunológica, mediada por células, típica de lesão inflamatória⁶.

De outra parte, LDL-OX, ou seus produtos, podem alterar outras propriedades vitais da parede arterial, com importantes conseqüências clínicas, como inibir o relaxamento das

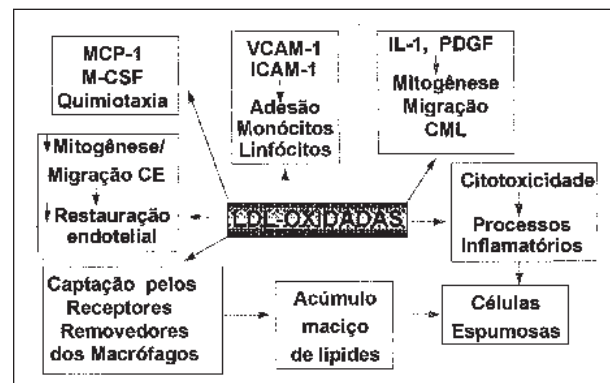


Fig. 2 - Características e propriedades principais das LDL-oxidadas; MCP-1- proteína quimiotática para monócitos (entrada na íntima); M-CSF- fator estimulador das colônias de monócitos (diferenciação); VCAM-1- molécula de adesão das células vasculares; ICAM-1- molécula de adesão da célula intracelular; CE- células endoteliais; IL-1- interleucina 1; PDGF- fator de crescimento derivado das plaquetas; R- receptores. Ademais, LDL-OX induzem à lesão endotelial, interferem com as respostas arteriais ao fator de relaxamento dependente do endotélio e são imunogênicas.

artérias coronárias mediado pelo fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF/NO), em resposta a vários agonistas. Certos produtos das LDL-OX, como oxiteróis, são altamente tóxicos para as células endoteliais e podem comprometer a integridade endotelial. Outros produtos podem estimular a liberação do fator tissular e iniciar o processo de coagulação. Finalmente, como as bordas das lesões ateroscleróticas, onde a ruptura da placa habitualmente ocorre, são ricas em células espumosas, contendo LDL-OX, essas partículas provavelmente participam também desse estágio tardio da aterosclerose, ou seja, ruptura da placa e trombose^{6,29}.

Evidências múltiplas apóiam a importância das LDL-OX no processo aterogênico *in vivo*⁶: 1) LDL extraídas de lesões ateroscleróticas exibem as propriedades físicas, biológicas e imunológicas atribuídas às preparações de LDL-OX *in vitro*; 2) embora formas de LDL altamente oxidadas não tenham sido encontradas no plasma, uma pequena proporção de partículas de LDL têm propriedades de LDL que sofreram o estágio inicial de modificação oxidativa (MM-LDL-OX)³⁰; 3) anticorpos a epítopos de LDL-OX são encontrados no soro de animais e do homem. Em alguns estudos, o título de tais anticorpos foi preditor da progressão da aterosclerose e suas complicações. IgG com especificidade para epítopos de LDL-OX pode ser isolada de lesões ateroscleróticas, nas quais estão presentes como parte de imuno-complexos com LDL-OX; 4) em coelhos e em primatas hipercolesterolêmicos, estudos com diferentes antioxidantes lipofílicos evidenciaram inibição da aterosclerose, provavelmente, devido à proteção da modificação oxidativa da LDL³¹; 5) evidências químicas da oxidação lipídica são observadas em todos os estágios de desenvolvimento da aterosclerose humana, tanto nas lesões iniciais, como nas intermediárias e avançadas, ricas em macrófagos^{32,33}.

Antioxidantes

O conteúdo de antioxidantes da partícula de LDL é crucial para sua proteção³⁴. Estudos *in vitro* mostraram que a oxidação de LDL somente se inicia após o estresse oxidativo haver depletado o conteúdo de antioxidante celular³⁵. *In vivo*, é provável que a magnitude do processo oxidativo e, mesmo, a ocorrência ou não de oxidação de LDL dependa do balanço entre a intensidade da agressão oxidativa e a capacidade das defesas antioxidantes⁶.

A hipótese de que a peroxidação lipídica desempenha importante papel na patogênese da aterosclerose despertou crescente entusiasmo sobre o uso de antioxidantes como agentes antiaterogênicos. Os antioxidantes mais investigados, tanto em experimentação animal, como no homem, têm sido o alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (precursor da vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides e probucol.

A **vitamina E**, cuja forma mais prevalente e ativa é o alfa-tocoferol, é o antioxidante lipossolúvel predominante nos tecidos e nas LDL³⁶. Estudos laboratoriais demonstraram que a vitamina E é antioxidante extremamente potente, que captura os radicais peróxila, interrompendo a cadeia de

peroxidação lipídica³⁷. Protege os lípidos poliinsaturados da lesão pelos radicais livres e parece essencial à proteção das lipoproteínas circulantes e ao funcionamento adequado das membranas celulares. Adicionada ao plasma, a vitamina E aumenta a resistência das LDL à oxidação³⁷.

Além de prevenir a peroxidação lipídica, a vitamina E parece exercer outros efeitos nos fatores de risco cardiovascular. Reduz a adesão e a agregação plaquetária³⁸; inibe os fatores de coagulação dependentes de vitamina K pela porção oxidada da vitamina E2-quinona³⁹, bem como a estimulação da produção de endotelina e atenua a inibição da produção de óxido nítrico mediada pela LDL-OX⁴⁰. Uma propriedade da vitamina E, compartilhada pelo probucol, é a inibição da secreção de IL-1 pelos monócitos, inibindo a proteína quinase C, enzima importante nos eventos precoces da ativação celular⁴¹. IL-1 está envolvida na proliferação de células musculares lisas e na diferenciação de monócitos, e seus níveis estão acentuadamente aumentados nas lesões ateroscleróticas³. Finalmente, a vitamina E influencia a função vasodilatadora das artérias de coelhos hipercolesterolêmicos⁴².

As fontes mais ricas em vitamina E são os óleos vegetais, especialmente de semente de girassol, grãos integrais, amêndoas, nozes, avelãs, verduras (espinafre, brócolis) e germe de trigo.

Beta-caroteno é um dos muitos carotenóides precursores da vitamina A e, por isso, designado pró-vitamina A, transportado no sangue primariamente pelas LDL. Antioxidante lipossolúvel é um potente seqüestrador do oxigênio *singlet*, principalmente em baixas pressões de oxigênio⁴³. O beta-caroteno, largamente distribuído na natureza, confere às frutas e vegetais muitas de suas cores vivas. É encontrado principalmente na cenoura, tomate, pimentão vermelho e amarelo, brócolis, couve, espinafre, agrião, pêssego e mamão.

Vitamina C, ou ácido ascórbico, é antioxidante hidrossolúvel, removedor dos radicais superóxido hidroxila e oxigênio *singlet*, antes que atinjam os lípidos celulares e iniciem a peroxidação⁴⁴. Ademais, preserva os níveis de vitamina E e beta-caroteno, antioxidantes endógenos na LDL, durante o estresse oxidativo⁴⁵. As fontes naturais mais ricas em vitamina C são a laranja, o limão e outras frutas cítricas, acerola, kiwi, cajú, tomate, pimentão, couve, espinafre, escarola, brócolis, nabo, páprica e repolho.

Flavonóides são compostos não nutritivos com potente atividade antioxidante, atribuída aos radicais fenólicos. São encontrados em diversos alimentos de origem vegetal, como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto. A quercitina, principal flavonóide, é removedora dos radicais superóxido⁴⁶, oxigênio *singlet* e peróxidos lipídicos⁴⁷ e inibe a oxidação das LDL e os efeitos citotóxicos das LDL-OX⁴⁸. O vinho tinto, que tem alto teor de flavonóides, reduz a oxidação de LDL *in vitro*⁴⁹; ademais, a ingestão de vinho tinto aumenta a atividade antioxidante do soro⁵⁰.

Probucol, potente antioxidante, protege a LDL contra modificação oxidativa *in vitro*⁵¹ e *in vivo*⁵². Outros mecanismos podem contribuir a seu efeito antiaterogênico poten-

cial: inibição da liberação de IL-1 pelos monócitos e da ativação da proteína quinase C⁴¹; redução da captação e degradação das lipoproteínas pelos macrófagos⁵³; aumento da atividade da colesterol éster transferase, aumentando a taxa de transferência dos ésteres de colesterol da HDL para frações de lipoproteínas de menor densidade⁵⁴.

No quadro I estão sintetizadas as propriedades desses agentes antioxidantes. Sua potencialidade terapêutica nas doenças cardiovasculares tem sido sugerida por estudos em animais e em humanos, empregando os mais diferentes métodos de investigação.

Estudos animais

Evidências sobre o papel protetor dos antioxidantes na aterogênese foram fornecidas por investigações experimentais em coelhos e ratos, utilizando o probucol. Na maioria delas, o probucol reduziu a área da aorta coberta por lesões ateroscleróticas em 40 a 50%⁴¹. As lesões dos animais tratados eram menores, menos celulares e predominaram células musculares lisas. Nos animais controle, os macrófagos eram mais numerosos que as células musculares lisas⁵⁵. Concluiu-se desses estudos que o efeito antiaterogênico do probucol, em animais, poderia ser devido a outros mecanismos além do antioxidante, como a estimulação ou inibição de fatores de crescimento, ou de citocinas mediadoras da migração e proliferação de células musculares lisas.

O efeito do probucol na reestenose pós injúria da artéria coronária por cateter-balão foi investigado em suínos. Em comparação com o grupo controle, os animais tratados apresentaram redução significativa da formação miointimal, com efeitos benéficos na espessura da íntima e no diâmetro luminal⁵⁶. Esses achados foram atribuídos às propriedades antioxidantes e removedoras de radicais livres do probucol.

Alguns estudos em animais mostraram que as vitaminas E e C podem também inibir a progressão da aterosclerose⁵⁷⁻⁵⁹. Em cobaias alimentadas com colesterol, o grupo que recebeu suplemento dietético de vitamina E desenvolveu lesões ateroscleróticas em menor número, quando comparado com o grupo controle⁶⁰. O exame histoquímico das aortas indicou que os animais do grupo controle, em comparação com os tratados com vitamina E, tinham concentração de proteoglicans aumentada na íntima, glicocalix reduzido na superfície endotelial e aumento da permeabilidade endotelial. Como o glicocalix é responsável pelas propriedades de superfície das células endoteliais, essas alterações podem ser consideradas pró-aterogênicas, pois induzem à retenção de LDL na parede arterial⁶¹.

Em primatas, a suplementação de vitamina E associou-se à redução da progressão das lesões ateroscleróticas da carótida, avaliada pelo Doppler, num período de três anos, embora sem alterar a histologia das lesões⁵⁹. Outros experimentos mostraram redução da área de infarto do miocárdio (IM) em coelhos alimentados com altas doses de vitamina E por 10 dias⁶², e em porcos que receberam o produto por via endovenosa, sete dias antes da indução da isquemia⁶³. Em contraste, num modelo canino de isquemia-reperusão,

embora a vitamina E houvesse prevenido as arritmias letais associadas à isquemia e reperusão, a área de infarto nos animais tratados com vitamina E foi maior do que nos animais controle⁶⁴.

Estudos ecológicos e "cross-sectional"

Evidências indiretas sobre os benefícios dos antioxidantes nas doenças cardiovasculares derivaram de alguns estudos ecológicos iniciais. A ingestão diária elevada de frutas e vegetais, refletindo provavelmente a ingestão de vitaminas antioxidantes e de outros componentes ativos neles contidos, associou-se inversamente com a incidência de doenças cardiovasculares⁶⁵⁻⁷³. Alguns desses estudos mostraram, inclusive, correlação negativa entre os níveis séricos de vitaminas antioxidantes e mortalidade coronária⁷⁰⁻⁷³.

Um estudo cooperativo internacional *cross-sectional* com amostras randomizadas, incluindo homens de meia-idade sadios de 16 populações européias, comparou os níveis plasmáticos de antioxidantes com índices regionais de mortalidade coronária. Na Escócia, Finlândia e Itália, não foi observada relação consistente entre os níveis de vitamina C e E e mortalidade por DAC⁷². Entretanto, quando todas as populações foram avaliadas, as medianas dos níveis plasmáticos de vitamina E correlacionaram inversamente com a mortalidade regional^{71,73}. De outra parte, não foi observada associação entre vitamina C, beta-caroteno e selênio com a mortalidade. Obviamente tais dados são suscetíveis de engano, pois não foi possível estabelecer ligação entre os níveis plasmáticos dessas substâncias com a DAC, individualmente.

Quadro I - Propriedades dos principais agentes antioxidantes

Composto	Propriedades
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none">• Antioxidante lipossolúvel potente• Previne a peroxidação lipídica• Reduz a ativação plaquetária e inibe os fatores de coagulação dependente da vitamina K• Inibe as ações da LDL-OX no endotélio• Inibe a secreção de interleucina-1 pelos monócitos
Beta-caroteno	<ul style="list-style-type: none">• Antioxidante lipossolúvel• Potente sequestrador do oxigênio <i>singlet</i>
Vitamina C	<ul style="list-style-type: none">• Antioxidante hidrossolúvel• Removedor dos radicais superóxido, hidroxila e oxigênio <i>singlet</i>• Preserva os níveis de vitamina E e beta-caroteno durante estresse oxidativo
Flavonóides	<ul style="list-style-type: none">• Atividade antioxidante potente, atribuída aos radicais polifenólicos• Quercitina remove radicais superóxido, oxigênio <i>singlet</i> e peróxidos lipídicos• Inibem oxidação das LDL e a atividade citotóxica das LDL-OX
Probucol	<ul style="list-style-type: none">• Potente antioxidante, protege a LDL da modificação oxidativa• Inibe a liberação de interleucina-1 pelos monócitos e ativação da proteína quinase C• Reduz a captação e degradação das lipoproteínas pelos macrófagos

Na maioria dos países, a ingesta elevada de gorduras saturadas correlaciona fortemente com a mortalidade por DAC, porém isto não se observa em algumas regiões da França. O "paradoxo francês", isto é, a aparente incompatibilidade entre dieta rica em gorduras e baixa incidência de DAC, tem sido atribuído ao consumo regular de vinho tinto⁷⁴. O conteúdo de álcool do vinho não parece ser a explicação para esse fenômeno, mas sim componentes não alcoólicos. O vinho tinto contém diversos compostos fenólicos, flavonóides e não flavonóides, incluindo catequinas, flavonóis, antocianinas e taninas solúveis. As propriedades antioxidantes desses compostos, reduzindo as reações de peroxidação lipídica, podem retardar o processo de aterogênese.

Estudo em voluntários mostrou que a ingestão de vinho tinto aumenta a atividade antioxidante do soro⁷⁵, em magnitude comparável à associada com inibição significante da LDL *in vitro*⁴⁹.

Estudos caso-controle e caso-controle "nested"

Nos estudos citados, os níveis plasmáticos de vitaminas antioxidantes foram comparados entre indivíduos com ou sem manifestação de DAC, ou que, subseqüentemente, a desenvolveram.

Estudo caso-controle em homens escoceses relatou relação inversa entre concentrações plasmáticas de vitamina E, vitamina C e caroteno, e a presença de angina de peito⁷⁶. Após ajustes para idade, tabagismo, pressão arterial, níveis lipídicos e peso relativo, somente a vitamina E mostrou associação independente. O risco relativo entre os quintis mais baixo e mais alto de concentração de vitamina E foi 2,68 (1,07 a 6,70).

Estudo caso-controle *nested* de Maryland mostrou que níveis plasmáticos elevados de beta-caroteno, porém não de alfa-tocoferol, associaram-se inversamente com a incidência de IM⁷⁷. De outra parte, um estudo de caso-controle *nested* do leste da Finlândia⁷⁸, região com alta mortalidade por DAC, e outro similar da Holanda⁷⁹, não evidenciaram associação consistente entre níveis plasmáticos de vitamina E, vitamina A (retinol) e selênio, e risco de morte por doença cardiovascular. Contudo, os níveis de antioxidantes foram determinados mais de sete anos após a coleta do sangue. Como os níveis de vitaminas antioxidantes tendem a diminuir com o tempo no sangue armazenado, o poder da associação foi provavelmente subestimado nesses estudos. Ainda, análises sanguíneas únicas não podem distinguir entre o uso a curto prazo do emprego prolongado dos antioxidantes, provavelmente necessário para avaliar seus efeitos nas doenças cardiovasculares⁸⁰.

Os resultados do *Euramic Study*⁸¹, ensaio caso-controle, multicêntrico, europeu, mostraram que indivíduos com concentrações de beta-caroteno no tecido adiposo, no quintil mais alto, tiveram risco significativamente menor de primeiro IM, quando comparados com indivíduos no quintil mais baixo. O risco aumentado foi observado principalmente entre fumantes.

Estudos de coortes prospectivos

Nos estudos observacionais prospectivos de coortes, um grande número de indivíduos foi acompanhado por determinado período de tempo. A incidência de doença cardiovascular no grupo com alta ingestão, por dieta ou suplemento vitamínico, ou níveis plasmáticos elevados de vitaminas antioxidantes, foi comparada com a incidência nos pacientes com menor ingestão ou níveis plasmáticos baixos.

O *US Nurses' Health Study*⁸², estudo prospectivo de grande coorte, incluiu 87.245 enfermeiras de 39 a 54 anos, sem evidência de doença cardiovascular ou câncer, submetidas a questionário dietético completo para avaliar o consumo de vários nutrientes, inclusive vitamina E. Durante seguimento médio de 8 anos, foram documentados 437 casos de IM não fatal e 115 mortes por DAC. Em comparação com as mulheres no quintil mais baixo de ingestão de vitamina E, as no quintil mais alto - correspondendo a uma diferença de pelo menos cinco vezes - apresentaram risco relativo de evento coronário principal de 0,66 (intervalo de confiança (IC) 95%; 0,50 a 0,87), após ajuste para idade e tabagismo. Ajustes adicionais para outros fatores de risco - ingestão calórica e de colesterol, hipertensão, diabete, atividade física, estado menopausal, uso de hormônios, aspirina e álcool - e nutrientes, inclusive outras vitaminas antioxidantes, tiveram pequeno efeito nos resultados. A maior parte da variabilidade na ingestão e redução do risco foi atribuída à suplementação de vitamina E. As mulheres que ingeriram suplemento de vitamina E por curtos períodos de tempo apresentaram benefício aparente pequeno, porém, nas que o utilizaram por mais de dois anos, o risco relativo de evento coronário principal foi 0,59 (IC 95%; 0,38 a 0,91), após ajuste para outros fatores de risco e uso de beta-caroteno, vitamina C e multivitaminas. A redução do risco absoluto foi 3,4 por 10.000 anos de seguimento (5,2 vs 8,5)⁸³.

Outro estudo prospectivo de grande coorte, o *US Health Professionals Study*⁸⁴, incluiu 39.910 profissionais de saúde do sexo masculino, de 40 a 75 anos, sem diagnóstico de DAC, diabete ou hipercolesterolemia, e que responderam a questionário pormenorizado para avaliar sua ingestão habitual de vitamina E, beta-caroteno, vitamina C e outros nutrientes. Cerca de 17% tomaram suplemento de vitamina E. Durante seguimento de quatro anos, 667 casos de DAC foram documentados. Os homens no quintil mais alto do consumo de vitamina E, comparados com os do quintil mais baixo, tiveram 40% (IC 95%; 19 a 56%) de redução do risco relativa (RRR) de infarto não fatal, morte por DAC, ou necessidade de cirurgia de revascularização miocárdica. Os dados foram ajustados para idade, profissão, outros fatores de risco, uso de aspirina, vitamina C e beta-caroteno. O uso de suplemento de vitamina E por período inferior a dois anos não se associou à redução do risco (RR) para eventos cardiovasculares. A redução do risco absoluto foi 6,0 por 10.000 anos de seguimento (50,9 vs 44,9)⁸³. A ingestão de beta-caroteno não se correlacionou com menor risco de DAC entre os indivíduos que nunca fumaram, porém se associou inversamente com o risco em fumantes

(RR 0,30; IC 95%, 0,11 a 0,82) e ex-fumantes (RR 0,60; IC 95%, 0,33 a 0,94). A ingestão de vitamina C não se associou a menor risco de DAC. A conclusão deste estudo e do precedente foi que, embora os dados prospectivos encontrados não provem relação causa-efeito, sugerem que o uso de vitamina E dietética, ou mais provavelmente por suplemento vitamínico, mantido por dois ou mais anos, associa-se à redução do risco para DAC fatal ou não.

Estudo de coorte prospectivo, na Finlândia, envolveu 2.748 homens e 2.385 mulheres, com 30 a 69 anos de idade e sem DAC diagnosticada⁸⁵. O consumo de alimentos foi estimado por método de história dietética compreendendo a dieta habitual total durante o ano anterior à inclusão no estudo. Durante seguimento médio de 14 anos, 186 homens e 58 mulheres morreram de DAC. A comparação do tercil mais alto com o mais baixo mostrou associação inversa entre a ingestão dietética de vitamina E e a mortalidade coronária, tanto em homens (RR 0,68; p=0,01 para tendência), como em mulheres (RR 0,35; p<0,01 para tendência). Esses dados foram ajustados para idade, tabagismo, colesterolemia, hipertensão, índice de massa corpórea e ingestão calórica. Associações similares foram observadas em relação à ingestão diária de vitamina C e carotenóides, no grupo de mulheres, e em relação à ingestão de importantes fontes alimentares desses micronutrientes, isto é, vegetais e frutas, tanto em homens como em mulheres. Concluíram os autores que esses resultados depõem a favor da hipótese que vitaminas antioxidantes exerçam efeitos benéficos na DAC, mas não pode ser desconsiderado que alimentos ricos nesses micronutrientes contenham outros elementos que possam contribuir aos benefícios observados.

Recentemente, foram publicados os resultados do *Iowa Women's Health Study*⁸⁶ em relação ao papel das vitaminas antioxidantes na prevenção da DAC. Esse estudo de coorte prospectivo envolveu 34.486 mulheres pós-menopausa, sem evidência de DAC à admissão, e que foram avaliadas quanto ao consumo de vitaminas E, A e C, de fontes alimentares e suplementos. Durante seguimento de sete anos, ocorreram 242 mortes por DAC. Em análise ajustada para idade e ingesta calórica total, o consumo de vitamina E associou-se inversamente com a mortalidade por DAC. Essa associação foi particularmente acentuada no subgrupo de 21.809 mulheres que não se utilizaram de suplementos de vitamina E; risco relativo do quintil mais baixo para o mais alto de ingestão dietética de vitamina E: 1,0, 0,68, 0,71, 0,42 e 0,42 (p para tendência = 0,008). Após ajuste para outros fatores, como hipertensão, tabagismo, colesterolemia, diabetes, nível de atividade física, índice de massa corpórea, consumo de álcool e terapêutica de reposição hormonal, essa associação inversa permaneceu com valores similares. Em contraste, não se observou associação entre a ingesta dietética de vitamina A, retinol, carotenóides ou vitamina C, com risco mais baixo de DAC.

O *Zutphen Elderly Study*⁸⁷, coorte prospectivo, abrangeu 552 homens com 50 a 69 anos de idade, incluídos em 1970 e acompanhados por 15 anos. Em publicação de 1993,

os autores relataram associação inversa entre ingestão de flavonóides e risco de DAC em homens idosos.

Estudo do mesmo grupo, recém publicado⁸⁸, mostrou associação inversa significativa entre a ingestão de flavonóides antioxidantes a longo prazo e a incidência de acidentes cerebrovasculares (AVC). Os homens com alta ingesta de flavonóides tiveram 73% de redução do risco de AVC, durante 15 anos de seguimento, em comparação com os indivíduos com baixa ingesta desses compostos. A ingestão de beta-caroteno, independente da de flavonóides, associou-se a redução não significativa de 46% do risco relativo de AVC. Em relação às vitaminas C e E, não foram observadas associações.

A associação entre a ingestão de flavonóides e a mortalidade por DAC foi avaliada em 16 coortes do *Seven Countries Study*⁸⁹, envolvendo 12.763 homens, com 40 a 59 anos no início do estudo. Após 25 anos de seguimento, a comparação *cross-cultural* sugeriu que a ingestão de flavonóides antioxidantes associou-se inversamente com a mortalidade por DAC, e explicou cerca de 25% da variância dos índices de DAC nas 16 coortes. Contudo, o consumo de gorduras saturadas foi o maior determinante das diferenças na mortalidade coronária, explicando 73% da variância total. Os resultados dessa comparação são consistentes com os do *Zutphen Elderly Study*⁸⁷, no qual a ingestão de flavonóides se associou, também, inversamente com a mortalidade por DAC.

A associação entre ingestão dietética de flavonóides e mortalidade coronária subsequente foi também avaliada em estudo coorte prospectivo, envolvendo 5133 homens e mulheres, com 30 a 69 anos e sem cardiopatia, de 30 comunidades da Finlândia⁹⁰. As observações iniciaram-se em 1967/72 e o acompanhamento foi até 1992. Os resultados, publicados em 1996, evidenciaram gradiente inverso significativo entre a ingestão de flavonóides e a mortalidade coronária e total, em mulheres. Os riscos relativos entre os quintis mais alto e baixo de ingestão dessas substâncias, ajustadas para idade, tabagismo, colesterolemia, pressão arterial e índice de massa corpórea foram 0,69 (IC 95%; 0,53-0,90) e 0,54 (0,33 a 0,87) para mortalidade total e coronária, respectivamente. Para os homens, os valores correspondentes foram 0,76 (0,63-0,93) e 0,78 (0,56-1,08), respectivamente. Concluíram os autores que indivíduos com baixa ingesta de flavonóides provavelmente apresentam maior risco de desenvolver DAC. As principais fontes dietéticas de flavonóides, nesse estudo, foram maçãs e cebolas.

Estudos randomizados e controlados

Os resultados do *Cambridge Heart Antioxidant Study* (CHAOS)⁹¹, ensaio duplo-cego, randomizado e controlado com placebo, sobre os efeitos da vitamina E em pacientes com cardiopatia isquêmica sintomática e com DAC comprovada angiograficamente, foram recém publicados, incluindo 2002 pacientes com seguimento médio de 510 dias. Receberam alfa-tocoferol 1035 pacientes; os primeiros 546 na dose de 800UI/dia e os restantes 489 na dose de 400UI/dia, sendo que 967 receberam cápsulas idênticas de placebo.

Os objetivos primários do ensaio foram a combinação de IM não fatal e mortalidade cardiovascular, e IM não fatal somente. As concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol, dosadas em subgrupos de pacientes, elevaram-se de um nível basal de 34,2umol/L para 51,1umol/L, no grupo tratado com 400UI/dia, e para 64,5umol/L, com 800UI/dia, porém não modificadas nos pacientes que receberam placebo. No grupo tratado, houve redução significativa do risco combinado de morte cardiovascular e infarto não fatal em relação ao grupo placebo: 41 vs 64 eventos (risco relativo 0,53; IC 95%, 0,34-0,83; p=0,005). Os efeitos benéficos foram devidos essencialmente à redução do risco de infarto não fatal: 14 vs 41 eventos (RR 0,23; IC 95%, 0,11-0,47; p=0,005). Contudo, a mortalidade cardiovascular foi ligeiramente maior no grupo alfa-tocoferol em relação ao placebo: 27 vs 23 (RR 1,18; IC 95%, 0,62-2,27; p=0,61). Os autores concluíram que, em pacientes com DAC sintomática comprovada pela angiografia coronária, alfa-tocoferol reduziu significativamente o risco de infarto não fatal, com benefícios consistentes após o 1º ano de tratamento, e que a avaliação dos efeitos dessa substância na mortalidade cardiovascular requer estudos adicionais.

O *Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study*⁹², randomizado, controlado, com angiografias coronárias seriadas, avaliou os efeitos da associação colestipol-niacina na progressão da DAC, em 156 homens, com 40 a 59 anos, previamente submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica. Nesse estudo, foram analisados subgrupos de pacientes em relação à ingestão dietética e de suplementos de vitamina E e C (não randomizado) em associação com dieta hipocolesterolêmica e colestipol-niacina, ou placebo (randomizado). No grupo tratado com dieta, colestipol e niacina, os pacientes que receberam suplemento de vitamina E ≥ 100 UI/dia mostraram menor progressão das lesões coronárias que os pacientes com ingestão < 100 UI, para todas as lesões (P=0,04) e para lesões leves/moderadas (P=0,01). Não foi demonstrado benefício em relação às lesões estenóticas mais graves. No grupo controle (dieta somente), não se observou efeito significativo com suplemento de vitamina

E. O uso de suplemento de vitamina C ou de multivitaminas não se associou a efeitos benéficos.

Conclusões

As evidências sobre a hipótese oxidativa da aterosclerose são consistentes. A modificação oxidativa da LDL é importante e, possivelmente, obrigatória no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Evidências químicas de oxidação lipídica são observadas em todos os estágios da aterogênese. As defesas antioxidantes naturais (endógenas) podem ser insuficientes. Teoricamente, os antioxidantes poderiam exercer efeitos favoráveis tanto nas lesões iniciais da DAC, como nas lesões intermediárias e avançadas, com as respectivas implicações clínicas, a longo, médio ou curto prazo.

Estudos ecológicos/epidemiológicos sugerem que a ingestão dietética deficiente de substâncias antioxidantes - vitamina E, vitamina C, beta-caroteno e flavonóides - e níveis sanguíneos baixos desses micronutrientes associam-se a maior incidência de eventos coronários. De outra parte, os estudos observacionais, coortes prospectivos, embora não provem relação causa-efeito, sugerem que a ingestão elevada dessas substâncias, especialmente da vitamina E, dietética ou suplementar, pode induzir à redução do risco de DAC. Dois estudos randomizados e controlados foram recentemente publicados, com resultados promissores. Outros estudos randomizados, multicêntricos, envolvendo grande número de indivíduos observados a longo prazo, e planejados especificamente, para avaliar os efeitos das vitaminas antioxidantes nas doenças cardiovasculares, estão em andamento. Admite-se que, paralelamente à correção vigorosa dos fatores de risco coronário, a ingestão de alimentos com alto teor desses micronutrientes e de flavonóides deva ser estimulada. Há consenso entre os autores, porém, que a recomendação pública para uso generalizado de suplementos de vitaminas antioxidantes não se justifica, até que esses estudos adicionais tenham sido completados e mostrem benefícios consistentes.

Referências

1. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL - Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-24.
2. Steinberg D, Witztum JL - Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA* 1990; 264: 3047-52.
3. Ross R - The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-09.
4. Steinbrecher UP, Zhang HF, Loughheed M - Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 155-68.
5. Witztum JL - Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993; 69: S12-S18.
6. Witztum JL - The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344: 793-5.
7. Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A - Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986; 77: 757-61.
8. Rankin SM, Parthasarathy S, Steinberg D - Evidence of a dominant role of lipoxigenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res* 1991; 32: 449-56.
9. Belkner J, Wiesner R, Rathman J et al - Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxigenases. *Eur J Biochem* 1993; 213: 251-61.
10. Morel DM, Di Corletto PE, Chisholm GW - Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 357-64.
11. Heinecke JW, Rosen H, Chait A - Iron and copper promote modification of low-density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74: 1890-4.
12. Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL - Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1994; 93: 1493-501.
13. Schenke DC, Carew TE - Initiation of atherosclerosis lesions in cholesterol-fed rabbits, I: focal increases in arterial LDL concentrations precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 908-18.
14. Schenke DC, Carew TE - Initiation of atherosclerosis lesions in cholesterol-fed rabbits, II: selective retention of LDL vs selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 908-18.
15. Nievelstein PFEM, Fogelman AM, Mottino G, Frank JS - Lipid accumulation in

- rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein: a deep-etch and immunolocalization study of rapidly frozen tissue. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 1795-805.
16. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al - Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488-96.
 17. Brown MS, Goldstein JL - Scavenging for receptors. *Nature* 1990; 343: 508-09.
 18. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D - A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264: 2599-604.
 19. Navab M, Hama SY, Nguyen TB, Fogelman AM - Monocyte adhesion and transmigration in atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 1994; 5: 198-204.
 20. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ et al - Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 5134-8.
 21. Rajavashith TB, Andalibi A, Territo MC et al - Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 1990; 344: 254-7.
 22. Schwartz D, Chaverri-Almada L, Berliner JA et al - The role of a gro homologue in monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest*. 1994; 94: 1968-73.
 23. Ku G, Thoma CA, Akeson AL et al - Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem* 1992; 267: 14183-8.
 24. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D - Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2805-09.
 25. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D - Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest*. 1993; 92: 1004-8.
 26. Kume N, Cybolsky MI, Gimbrone MA Jr - Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1138-44.
 27. Kume N, Gimbrone MA Jr - Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994; 93: 907-11.
 28. Murugesan G, Chisolm GM, Fox PL - Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 1993; 120:1011-9.
 29. Steinberg D - Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? *Lancet* 1995; 346: 36-8.
 30. Hodis HN, Krams DM, Avogaro P et al - Biochemical and cytotoxic characteristic of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL). *J Lipid Res* 1994; 35: 669-77.
 31. Sasahara M, Raines EW, Carew TE et al - Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in *Macaca nemestrina* by probucol I: intimal lesion area correlates inversely with resistance of lipoproteins to oxidation. *J Clin Invest* 1994; 94: 155-209.
 32. Carpenter KLH, Taylor SE, van der Veen C, Williamson BK, Ballantine JA, Mitchinson MJ - Lipids and oxidised lipids in human atherosclerosis lesions at different stages of development. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1256: 141-50.
 33. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF - Lipid and fatty acid distribution in nonulcerated and ulcerated human aortic plaques. *J Vasc Med Biol* 1993; 4: 228-34.
 34. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G - The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-90.
 35. Jessup W, Rankin SM, De Whalley CV, Hoult JR, Scott J, Leake DS - Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1990; 265: 399-405.
 36. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H et al - The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann NY Acad Sci*. 1989; 570: 254-67.
 37. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G - Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(suppl): 314S-321S.
 38. Steiner M - Influence of vitamin E on platelet function in humans. *J Am Coll Nutr* 1991; 10: 466-73.
 39. Dowd P, Zheng ZB - On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8171-5.
 40. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF - Oxidized low density lipoprotein induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 1992; 70: 1191-7.
 41. Jackson RL, Ku G, Thomas CE - Antioxidants: A biological defense mechanism for the prevention of atherosclerosis. *Med Res Rev* 1993; 13: 161-82.
 42. Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A et al - Low-dose (-tocopherol improves and high-dose -tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol fed rabbits. *J Clin Invest* 1994; 93: 844-51.
 43. Burton GW, Ingold KU - β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984; 224: 569-73.
 44. Jialal I, Fuller CJ - Effect of vitamin E, vitamin C and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can J Cardiol* 1995; 11(suppl G): 97G-103G.
 45. Packer JE, Slater TF, Willson RL - Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature (London)* 1979; 278: 737-8.
 46. Robak J, Gryglewski RJ - Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 83-8.
 47. Husain SR, Cillard J, Cillard P - Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 1987; 26: 2489-92.
 48. Negre-Salvagyre A, Salvagyre R - Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized low-density lipoproteins by macrophages. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 101-6.
 49. Frankel EN, Kanner J, German GB et al - Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341: 454-7.
 50. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G - Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994; 344: 193-4.
 51. Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D - Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1986; 77: 641-4.
 52. Masana L, Bargalló T, Plana N, LaVila A, Casals I, Solà R - Effectiveness of probucol in reducing plasma low-density lipoprotein cholesterol oxidation in hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1991; 68: 863-7.
 53. Carew TE, Schwenke DC, Steinberg D - Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks slowing the progression of atherosclerosis in the WHHL rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7725-9.
 54. Franceschini G, Sirtori M, Vaccarino V et al - Mechanisms of HDL reduction after probucol: Changes in HDL subfractions and increased reverse cholesteryl ester transfer. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 462-9.
 55. O'Brien K, Nagano Y, Gown A, Kita T, Chait A - Probucol treatment affects the cellular composition but not anti-oxidized low density lipoprotein immunoreactivity of plaques from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 751-9.
 56. Schneider JE, Berk BC, Gravanis MB et al - Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury: A possible role for antioxidants in restenosis. *Circulation* 1993; 88: 628-37.
 57. Gaziano JM, Manson JE, Buring JE et al - Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 249-59.
 58. Simon JA - Vitamin C and cardiovascular disease: a review. *J Am Coll Nutr* 1992; 11: 107-25.
 59. Verlangieri AJ, Bush MJ - Effects of d-alpha-tocopherol supplementation on experimentally induced primate atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1992; 11: 131-8.
 60. Qiao Y, Yokoyama M, Kameyama K, Asano G - Effect of vitamin E on vascular integrity in cholesterol-fed guinea pigs. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1885-92.
 61. Elinder LS, Walldius G - Antioxidants and atherosclerosis progression: unresolved questions. *Current Opinion Lipidology* 1994; 5: 265-8.
 62. Axford-Gatley RA, Wilson GJ - Reduction of experimental myocardial infarct size by oral administration of alpha-tocopherol. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 89-92.
 63. Klein HH, Pich S, Lindert S, Niebendahl K, Niedmann P, Kreuzer H - Combined treatment with vitamins E and C in experimental myocardial infarction in pigs. *Am Heart J* 1989; 118: 667-73.
 64. Sebbag L, Forrat R, Canet E, Renaud S, Delaye J, de Lorgeril M - Effects of dietary supplementation with alpha-tocopherol on myocardial infarct size and ventricular arrhythmias in a dog model of ischemia-reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1580-5.
 65. Acheson RM, Williams DRR - Does consumption of fruit and vegetables protect against stroke? *Lancet* 1983; 1: 1191-3.
 66. Garcia-Palmieri MR, Sorlie P, Tillotson J et al - Relationship of dietary intake to subsequent coronary heart disease incidence. The Puerto Rico Heart Health Program. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 1818-27.
 67. Kromhout D, De Lezenne Coulander C - Diet, prevalence and 10-year mortality from coronary heart disease in 871 middle-aged men. The Zutphen Study. *Am J Epidemiol* 1984; 119: 733-41.
 68. Kushi LH, Lew RA, Stare FJ et al - Diet and 20-year Ireland-Boston Diet-Heart Study. *N Engl J Med* 1985; 312: 811-8.
 69. Khaw K-T, Barrett-Connor E - Dietary fiber and reduced ischemic heart disease mortality rates in men and women: a 12-year prospective study. *Am J Epidemiol* 1987; 126: 1093-102.
 70. Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB - Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 1368-77.
 71. Gey KF, Puska P - Plasma vitamins E and A inversely correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570: 268-82.
 72. Riemersma RA, Oliver M, Elton RA et al - Plasma antioxidants and coronary heart disease: vitamins C and E, and selenium. *Eur J Clin Nutr* 1990; 44: 143-50.
 73. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK - Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(suppl 1): 326S-34S.
 74. Renaud S, de Lorgeril M - Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-6.

75. Maxwell S, Cruickshank A, Thorpe G - Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994; 344: 193-4.
76. Riemersma RA, Wood DA, MacIntyre CCA, Elton RA, Gey KF, Oliver MF - Risk of angina pectoris and plasma concentration of vitamins A, C and E and carotene. *Lancet* 1991; 337: 1-5.
77. Street DA, Comstock GW, Salkeld RM, Schüep W, Klag M - A population-base case-control study of the association of serum antioxidants and myocardial infarction. *Am J Epidemiol* 1991; 134: 719-20.
78. Salonen J, Salonen R, Penttilä I et al - Serum fatty acids, apolipoproteins, selenium and vitamin antioxidants and the risk of death from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1985; 56: 226-31.
79. Kok FJ, de Bruijn M, Vermeeren M et al - Serum selenium vitamin antioxidants, and cardiovascular mortality: a 9-year follow-up study in the Netherlands. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 462-8.
80. Comstock GW, Alberg AJ, Helzlsouer KJ - Reported effects of long-term freezer storage on concentrations of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in serum or plasma summarized. *Clin Chem* 1993; 39: 1075-8.
81. Kardinal AFM, Kok FJ, Ringstad J et al - Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *Lancet* 1993; 342: 1379-84.
82. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE et al - Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1444-9.
83. Prabhat JHA, Flather M, Lonn E, Farkouth M, Yusuf S - The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med* 1995; 123: 860-72.
84. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A et al - Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328: 1450-6.
85. Knekt P, Reunanen A, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Aromaa A - Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 1180-9.
86. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ et al - Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334: 1156-62.
87. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D - Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-11.
88. Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D - Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke - The Zutphen Study. *Arch Intern Med* 1996; 154: 637-42.
89. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C et al - Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381-6.
90. Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J - Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 1996; 312: 478-81.
91. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM et al - Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 346: 781-6.
92. 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: 1849-54.