

ESTRESSE OXIDATIVO NA ATEROSCLEROSE E REESTENOSE PÓS-ANGIOPLASTIA

CONCEITOS BÁSICOS E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Serviço de Fisiologia Aplicada, Laboratório de Biologia Vascular

Dr. Protásio Lemos da Luz

Laboratório de Biologia Vascular, Unidade Clínica de Aterosclerose do Instituto do Coração (InCor) – HCFMUSP

A elaboração de um modelo de regulação da função e estrutura vascular centrado em processos redox (i.e., reações de transferência de elétrons) foi um dos mais significativos avanços da fisiologia vascular. As inúmeras investigações recentes relacionadas a tal modelo foram desencadeadas pela identificação do óxido nítrico (NO) – um radical livre gasoso instável e altamente difusível – como um importante fator vasorrelaxante derivado do endotélio. O conceito inovador de que um simples e pequeno intermediário químico fosse capaz de exercer transdução de sinais biológicos específicos de modo autócrino (i.e., na própria célula de origem) ou parácrino (i.e., em células fisicamente contíguas) foi logo estendido a outras espécies ativas em sistemas redox, particularmente *espécies reativas derivadas do oxigênio* (ERO). O radical superóxido, uma das principais ERO de interesse biológico, reage de modo rápido e favorável com o óxido nítrico, não apenas inibindo sua bioatividade, como também gerando potencialmente outras espécies reativas oxidantes secundárias, p. ex., peroxinitrito. O equilíbrio interativo entre esses intermediários é um forte determinante da função celular, por meio da regulação de certas proteínas específicas ou de lipídeos. Dessa forma, a *disfunção endotelial/vascular pode, sob vários ângulos, ser resumida como uma disfunção da sinalização redox vascular*. Esta últi-

ma pode ser definida como a transdução de sinais celulares mediada por reações de transferência de elétrons envolvendo radicais livres (definidos como intermediários capazes de existência independente, que apresentam um elétron desemparelhado na última camada), metais de transição ou equivalentes redutores (p. ex., o íon hidrogênio, que possui um próton e um elétron).

A sinalização redox pode, assim, ter duas faces reconhecidamente distintas. Em condições normais, níveis controlados, regulados ou compartimentalizados (i.e., em um microambiente celular específico) de ERO exercem função de segundos mensageiros de processos celulares vitais para as constantes adaptações fisiológicas do vaso. Entretanto, a produção excessiva, não-compensada ou descompartimentalizada de ERO, conhecida como *estresse oxidativo*, leva a toxicidade, que pode ser de dois tipos:

- um desequilíbrio na sinalização de células vasculares (processo que nós denominamos recentemente “toxicidade biológica das ERO”,
- toxicidade química direta de ERO, que é devida à alta reatividade dessas espécies contra virtualmente todos os componentes químicos celulares. A produção de ERO é usualmente um processo enzimático e estimulado por agonistas específicos cujos níveis estão anormais em condições patológicas.

A tabela 1 lista vários alvos protéicos celulares, cuja modulação é dependente de processos redox e que podem, assim, mediar as conseqüências de um estresse oxidativo na fisiopatologia de doenças vasculares. Os dados estão revistos com maior detalhe nas referências 3, 4, 6, 7 e 9.

Endereço para correspondência:

Francisco R. M. Laurindo

Instituto do Coração (InCor)

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 44 – subsolo

05403-000 – São Paulo

Tel.: (11) 3069-5184 – Fax: (11) 3082-2354

E-mail: expfrancisco@incor.usp.br

Tabela 1

Vias de sinalização intracelular sensíveis à regulação redox

- Quinases¹
(ex.: MAP quinases, tirosinoquinases)
- Fosfatases²
(ex.: tirosinofosfatases)
- Fatores de transcrição³
(ex.: NF-kappaB, AP-1)
- Receptores
(ex.: glicocorticóides)
- Proteases
(ex.: metaloproteinases de matriz⁴)

¹ Quinases são proteínas que adicionam um grupo fosfato a um dado substrato, usualmente uma proteína, que é então ativada. Existem várias quinases, essenciais à regulação do metabolismo e à sinalização celular; p. ex.: o receptor de insulina.

² Fosfatases são enzimas que fazem o contrário das quinases, i.e., desfosforilam um dado substrato.

³ Fatores de transcrição são proteínas, usualmente citoplasmáticas, que respondem a estímulos bastante específicos (ex.: estresse oxidativo, no caso do NF-kappaB) e, quando ativadas, migram para o núcleo, ligando-se a sequências de DNA na região promotora de genes responsivos a este fator e dando início a todo o programa de síntese de várias proteínas (associadas à resposta inflamatória, no caso do NF-kappaB).

⁴ Metaloproteinases são uma família de enzimas que digerem matriz extracelular e estão ativadas durante a remodelação tecidual; p. ex.: na cápsula do ateroma instável.

Uma das principais vias finais comuns do estresse oxidativo é a perda da bioatividade do óxido nítrico, que freqüentemente pode ser detectada como uma redução da vasodilatação dependente do endotélio. Este último processo, entretanto, é apenas uma dentre várias manifestações do complexo desequilíbrio redox e dos múltiplos déficits funcionais associados à disfunção endotelial/vascular. A ocorrência de estresse oxidativo tem sido documentada na aterosclerose, hipertensão arterial, *Diabetes mellitus*, hiper-homocisteinemia e reestenose pós-angioplastia, e pode ser relevante para um entendimento aperfeiçoado da fisiopatologia dessas condições.

VIAS ENZIMÁTICAS DE PRODUÇÃO DE ERO EM SISTEMAS VASCULARES

Enquanto as vias enzimáticas de produção do óxido nítrico estão bem caracterizadas, com três isoformas conhecidas das NO sintases (neuronal ou NOS1, induzível ou NOS2 e endotelial ou NOS3), as enzimas responsáveis pela geração de superóxido e água oxigenada no vaso estão ainda por ser esclarecidas. Fica claro, entretanto, que tais enzimas e os mecanismos que as regulam são elementos integrativos importantes na sinalização e, em última análise, no ambiente redox celular. As principais vias enzimáticas de produção de ERO estão listadas na tabela 2.

Tabela 2

Principais fontes enzimáticas de superóxido no vaso

NAD(P)H oxidase

Complexo enzimático semelhante àquele utilizado pelo fagócito para eliminação de bactérias, cuja importância será discutida no texto.

NO sintase(s)

Sob condições de deficiência de cofatores da enzima podem gerar, ao invés do NO, o radical superóxido. Esse mecanismo pode contribuir para o estresse oxidativo nas fases iniciais da aterosclerose e na vasculopatia diabética. A reposição do derivado do ácido fólico tetrahidrobiopterina, um dos principais dentre esses cofatores, pode normalizar agudamente a função endotelial na aterosclerose em pacientes.

Xantina oxidase

Pode aderir à membrana basal da parede vascular. Vários estudos clínicos têm sido dirigidos para avaliar a importância desta enzima na geração de ERO em patologias vasculares como a aterosclerose; porém, em geral provas mais definitivas não foram ainda fornecidas.

Citocromo P450

Pode oxidar o ácido araquidônico a epxi-metabólitos com propri-

edades vasodilatadoras e hiperpolarizantes da musculatura lisa. Essa atividade constitui-se em uma das faces do assim denominado "fator hiperpolarizante derivado do endotélio", importante na fisiopatologia da hipertensão arterial. O papel desta enzima como produtora de superóxido na aterosclerose foi pouco estudado.

Lipoxigenases

Podem ser importantes na peroxidação lipídica enzimática nos estágios iniciais da aterosclerose. Estudos clínicos com inibidores da 15-lipoxigenase, entretanto, não conseguiram confirmar tal importância.

Cadeia de transferência de elétrons em mitocôndrias

Talvez seja o principal mecanismo de geração fisiológica celular de ERO. Sua participação em patologia vascular, entretanto, não foi convincentemente documentada.

Ativação de leucócitos

Participam de vários estágios da aterosclerose. Os inúmeros estudos mostrando produção de ERO diretamente pelas células vasculares indicam que leucócitos, embora potencialmente importantes, não são a única fonte de ERO no ambiente da placa.



NAD(P)H OXIDASE VASCULAR

Embora esteja claro que uma NAD(P)H oxidase semelhante à do leucócito é uma importante, se não a principal, fonte de espécies radicalares na parede vascular, a estrutura desta enzima não está completamente elucidada. Além disso, processos fisiológicos reguladores e interações protéicas da oxidase não estão claros. A oxidase vascular é um complexo enzimático com várias subunidades, que geram superóxido apenas quando montadas (como se fosse um quebra-cabeças). A existência dessas subunidades reflete um sofisticado mecanismo de regulação dessa enzima potencialmente letal à célula. Uma das subunidades mais expressas e estudadas no vaso é a proteína *p22phox* (i.e., um peptídeo de peso molecular 22 kD); alguns polimorfismos genéticos dessa proteína estão associados a risco aumentado de doença coronária e acidente vascular cerebral. Em relação à principal subunidade da oxidase, os estudos mostram diferenças entre a oxidase vascular e a dos leucócitos, principalmente a subunidade *gp91phox*, ausente nas células musculares lisas, que expressam em seu lugar a subunidade *nox-1*, que é induzida pela angiotensina II. Recentemente, nosso laboratório evidenciou importante papel de tióis reativos (i.e., peptídeos ou proteínas contendo o aminoácido cisteína, que contém um grupo -SH ou sulfidril) na modulação da atividade da NAD(P)H oxidase vascular.

A principal função da oxidase vascular parece estar associada à sinalização celular em resposta a vários agonistas estimuladores ou, em células especializadas, a mecanismos sensores de oxigênio. Dessa forma, os principais ativadores conhecidos da oxidase exercem seus efeitos fisiológicos (crescimento, secreção de matriz, morte celular), pelo menos em parte, via produção intracelular de superóxido ou água oxigenada. Os principais agonistas da NAD(P)H oxidase vascular estão listados na tabela 3 e correspondem a mediadores envolvidos em diversos processos fisiopatológicos vasculares. Dentre estes, destaca-se a angiotensina II.

Antagonistas potenciais da NAD(P)H oxidase estão sendo procurados e estudados quanto a um eventual benefício terapêutico em doenças vasculares.

PRODUÇÃO DE ERO NA RESPOSTA VASCULAR A LESÃO E ATEROSCLEROSE

Uma das situações clínicas em que mudanças do tipo da aterosclerose acelerada ocorrem no vaso é a reestenose pós-angioplastia. Nosso laboratório

tem estudado o perfil redox da resposta vascular à lesão. Imediatamente após a distensão da parede vascular por cateter-balão, ocorre intenso estresse oxidativo provavelmente secundário à ativação de NAD(P)H oxidase vascular, uma vez que a produção de radicais foi bloqueada por um inibidor dessa enzima, mas não por vários outros inibidores de outras fontes de ERO. A lesão vascular levou à ativação redox do fator de transcrição NF-kappaB, que ativa um programa gênico associado a proteínas mediadoras de processo inflamatório. Dessa forma, mesmo um estresse oxidativo transitório pode ter efeitos a longo prazo nas respostas vasculares. Medidas tardias de estresse oxidativo não mostraram nas fases de reparação o mesmo grau de estresse oxidativo verificado logo após a lesão, embora estudos recentes tenham mostrado aumentos da NAD(P)H oxidase na parede vascular. Dados recentes de nosso laboratório mostram ainda que a deficiência sustentada da superóxido dismutase, a principal enzima seqüestradora do radical superóxido, contribui para o remodelamento negativo do vaso após uma lesão por inibir a bioatividade do NO.

Na aterosclerose, inúmeros trabalhos têm evidenciado a ocorrência de estresse oxidativo vascular, tanto em modelos experimentais como em situações clínicas. O aumento da produção de superóxido tem sido demonstrado em todas as camadas da parede vascular, particularmente o endotélio e a adventícia. A via enzimática responsável por essa geração parece ser a NAD(P)H oxidase, estimulada especificamente pela angiotensina II. Tal estresse oxidativo leva a um dos achados mais caracte-

Tabela 3

Principais agonistas ativadores da NAD(P)H oxidase vascular

- Angiotensina II
- Fatores de crescimento, particularmente PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)
- Trombina
- Ácido araquidônico
- Forças hemodinâmicas (fluxo pulsátil oscilatório)
- LDL-oxidada
- Lesão vascular por angioplastia
- Citocinas (TNF- α ou IL-1 β)





rísticos de artérias ateroscleróticas, que é a perda do relaxamento dependente do endotélio na parede vascular. A redução do relaxamento dependente do endotélio ocorre também em vasos sem evidência de placas, na presença de fatores de risco da doença (ex.: hiperlipidemia, diabetes, hipertensão), fazendo supor que um dos mecanismos pelos quais os fatores de risco levam à aterosclerose é a disfunção endotelial.

O estresse oxidativo na aterosclerose está intimamente relacionado e mescla-se com a assim chamada “teoria oxidativa da aterogênese”, que propõe um papel essencial da oxidação da partícula de LDL na patogenia da aterosclerose. Os principais efeitos pró-aterogênicos da LDL-oxidada (revisitos nas refs. 25 e 26) são: retenção no espaço subendotelial, quimiotaxia para monócitos, toxicidade para a célula endotelial, ativação da produção de superóxido, indução de enzimas pró-inflamatórias, como a NO sintase induzível, e, particularmente, fagocitose pelos macrófagos, que assim se transformam nas características células espumosas da aterosclerose. Vários estudos têm conclusivamente demonstrado no homem a presença da oxidação da LDL e efeitos pró-inflamatórios da mesma. Os estudos com compostos hipolipemiantes da família das vastatinas têm demonstrado significativa melhora da função endotelial em conexão com redução do “pool” total de LDL-oxidada. Entretanto, os estudos com antioxidantes, que seriam a comprovação direta dessa teoria, não foram ainda capazes de validá-la no âmbito clínico.

ESTUDOS CLÍNICOS COM ANTIOXIDANTES

Na reestenose pós-angioplastia, estudos clínicos mostram um efeito relativamente consistente do antioxidante probucol (revisito na ref. 19), cujo benefício parece ser devido principalmente à inibição do remodelamento constritivo do vaso, ao invés da proliferação neo-intimal. Em contraste, estudos clínicos com multivitaminas (betacaroteno, vitaminas C e E) não mostraram efeitos conclusivos. Recentemente, o estudo multicêntrico local ANIST (“Antioxidants in Stent”, coordenado pelo Prof. Protásio L. da Luz, InCor) avaliou o papel do probucol na reestenose após implantação de “stents” coronários. Os resultados mostraram pequeno efeito protetor do probucol, que não alcançou significância estatística.

Vários outros estudos com antioxidantes (revisitos nas refs. 25 e 26) têm sido conduzidos na prevenção primária e secundária da aterosclerose, particularmente a vitamina E. Em geral, entretanto, tais

estudos têm demonstrado ausência de efeito desses compostos na redução da incidência de morte de origem cardiovascular, mortalidade total e outras ocorrências cardiovasculares. Nessa categoria estão incluídos os estudos HOPE, GISSI, ATBC e CHAOS, bem como uma metanálise desses estudos perfazendo quase 50 mil pacientes tratados. O estudo CHAOS foi uma exceção a essa tendência e mostrou proteção contra novos eventos cardíacos em pacientes que sofreram infarto do miocárdio e foram tratados com vitamina E. Recentemente, os resultados do “Heart Protection Study” envolvendo cerca de 20 mil pacientes não demonstraram efeitos a curto ou longo prazo de multivitaminas (vitaminas E, C e betacaroteno) na mortalidade cardiovascular ou geral, bem como nos eventos cardiovasculares. Em contraste, o tratamento com vastatinas demonstrou benefício nas variáveis cardiovasculares analisadas, incluindo acidente vascular cerebral.

ANGIOTENSINA E ESTRESSE OXIDATIVO NA ATEROSCLEROSE

Estudos recentes (revisitos na ref. 28) têm demonstrado que o sistema renina-angiotensina-aldosterona contribui para a patogênese da aterosclerose. Essa contribuição não reflete apenas as ações vasoconstritoras e estimulantes do crescimento de células musculares lisas, tradicionalmente consideradas quanto ao envolvimento desse sistema na hipertensão arterial. Além disso, principalmente por meio da indução de estresse oxidativo, a angiotensina II tem um papel significativo na ativação de mecanismos pró-inflamatórios na parede vascular, com ações que incluem: ativação da NAD(P)H oxidase vascular, produção de superóxido e água oxigenada, estímulo para secreção de fatores de crescimento, ativação de leucócitos e estímulo, via processos redox, de inúmeras citocinas inflamatórias. A angiotensina II pode estimular diretamente também a NAD(P)H oxidase dos neutrófilos. Vários estudos experimentais demonstram antagonismo da aterosclerose induzida por inibidores da enzima conversora ou antagonistas dos receptores AT1; em particular, losartan inibe a aterosclerose em primatas hipercolesterolêmicos. Estudos clínicos têm dado suporte a tal conceito, sugerindo benefício de antagonistas da angiotensina na prevenção da aterosclerose e na reversão da disfunção do endotélio vascular, particularmente o estudo HOPE. Dessa forma, o antagonismo da angiotensina II pode ser uma importante intervenção antioxidante, capaz de retardar a gênese e as consequências clínicas da aterosclerose.



CONCLUSÃO: RESULTADOS NEGATIVOS DOS ESTUDOS CLÍNICOS COM ANTIOXIDANTES INVALIDAM O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA ATEROSCLEROSE?

Uma vez que estudos com antioxidantes são os mais imediatamente aplicáveis à clínica, é lícito perguntar se esse tipo de investigação não deveria ter prioridade por ser aquele que fornece os dados mais diretos. Ao mesmo tempo, é lógico perguntar se os resultados negativos discutidos acima invalidam até certo ponto o papel do estresse oxidativo na doença aterosclerótica.

A resposta a essas perguntas é *sim e não*. *Sim*, pois esse tipo de estudo é, em última análise, a ferramenta necessária e essencial para demonstrar a aplicabilidade clínica de qualquer intervenção antioxidante. *Não*, pois existem várias limitações nas implicações mecânicas desse tipo de estudo com antioxidantes, dentre as quais:

- muitos processos redox antagonizados pelos antioxidantes podem ser benéficos;

- os antioxidantes disponíveis atualmente são muito pouco específicos e podem não ser acessíveis a microambientes celulares essenciais;
- processos redox dependem ao mesmo tempo de eventos oxidativos e redutores, e os resultados de um antioxidante podem ser contraditórios;
- muitos antioxidantes exibem um efeito pró-oxidante dependente da concentração.

Acreditamos que um conhecimento mais relevante sobre estratégias antioxidantes efetivas deverá requerer estudos aprofundados sobre a fisiologia e mecanismos bioquímicos do estresse oxidativo vascular. Como freqüentemente acontece, o investigador clínico, para atingir objetivos relevantes e às vezes não-suspeitados, deve sacrificar o pragmatismo e exercitar sua curiosidade nos moldes do método científico clássico. ■

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987; 327: 524–6.
2. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrn RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 9265–9.
3. Abe JI, Berk BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 1998; 8: 59–63.
4. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*, 2000; 87: 179–83.
5. Laurindo FRM, Pedro MA, da Luz PL, Augusto O. Oxygen-derived free radicals as signaling mediators in the vascular system. *C Cult J Braz Assoc Adv Sci*, 1996; 46: 18–27.
6. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res*, 1999; 85: 753–66.
7. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, 2000; 28: 463–99.
8. Laurindo FRM, da Luz PL. Influência de processos redox na resposta de reparação vascular à lesão. *Rev Soc Cardiol Est S Paulo*, 1996; 6: 171–89.
9. Laurindo FRM, Souza HP, da Luz PL. Estresse oxidativo: um denominador comum de condições vasculares patológicas. *Rev Soc Cardiol Est S Paulo*, 1998; 8: 334–55.
10. Laurindo FRM, Pedro MA, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MHC, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res*, 1994; 74: 700–9.
11. Laurindo FRM, Souza HP, Pedro MP, Janiszewski M. Redox aspects of vascular response to injury. *Met Enzymol*, 2002; 352: 432–54.
12. Laurindo FRM, Souza HP, Janiszewski M, Azevedo LCP, Pedro MA. The redox hypothesis of restenosis post-angioplasty. Modernistic esthetics of cell signaling underlying the vascular repair reaction. *Ci Cult J Braz Assoc Adv Sci*, 2001; 52: 334–44.
13. Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions and the vascular system. *Pharm Res*, 1996; 13: 649–62.
14. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol*, 2001; 12: 383–9.
15. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 2000; 86: 494–501.
16. Cahilly C, Ballantyne CM, Lim D-S, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22^{phox}, involved in the generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res*, 2000; 86: 391–5.
17. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, 2001; 88: 888–94.
18. Janiszewski M, Pasqualucci CA, Souza LC, Pileggi F, da Luz PL, Laurindo FRM. Oxidized thiols markedly amplify the vascular response to balloon injury in rabbits through a redox active metal-dependent mechanism. *Cardiovasc Res*, 1998; 39: 327–38.
19. Azevedo LCP, Pedro MA, Souza LC, Souza HP, Janiszewski M, da Luz PL, Laurindo FRM. Oxidative stress as a signaling mechanism of the vascular response to injury. The redox hypothesis of restenosis. *Cardiovasc Res*, 2000; 47: 436–55.
20. Souza HP, Souza LC, Anastacio VM, Pereira AC, Junqueira ML, Krieger JE, da Luz PL, Augusto O, Laurindo FRM. Vascular oxidant stress early after balloon injury. Evidence for increased NAD(P)H oxidoreductase activity. *Free Radic Biol Med*, 2000; 28: 1232–42.
21. Szocs K, Lassegue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22: 21–7.
22. Leite PF, Danilovic A, Pedro MA, Azevedo LCP, Laurindo FRM. Deficiência da superóxido dismutase extracelular contribui para o remodelamento negativo após angioplastia em coelhos. *Rev Soc Cardiol S Paulo*, 2001; 11(Supl. B): 33.
23. Warnholtz A, Nickening G, Schulz E, Macharzina R, Brasen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Bohm M, Meinertz T, Munzel T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 1999; 99: 2027–33.
24. Warnholtz A, Mollnau H, Oelze M, Wendt M, Munzel T. Antioxidants and endothelial dysfunction in hyperlipidemia. *Curr Hypertens Rep*, 2001; 3: 53–60.
25. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med*, 2001; 11: 93–102.
26. Parthasarathy S, Khan-Merchant N, Penumetcha M, Khan BV, Santanam N. Did the antioxidant trials fail to validate the oxidation hypothesis? *Curr Atheroscler Rep*, 2001; 3: 392–8.
27. Collins R, Peto R, Armitage J. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int J Clin Pract*, 2002; 56: 53–6.
28. Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 2001; 87: 25C–32C.
29. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 2000; 342: 154–60.
30. Ferrario CM. Use of angiotensin II receptor blockers in animal models of atherosclerosis. *Am J Hypert*, 2001; 15: 9S–13S.
31. Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in Diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 2001; 15: 203–10.
32. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*, 2001; 88: 44–51.