
Modelo porcino de disfunción endotelial inducida por hipercolesterolemia. Efecto de las vitaminas C y E

Porcine model of endothelial dysfunction induced by hipercholesterolemia. Effect of vitamins C and E

E. Alegría, J.A. Rodríguez, A. Grau, M. Belzunce, D. Martínez Caro

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis, primera causa de muerte en los países desarrollados, constituye el principal elemento contribuyente al desarrollo de los infartos miocárdico y cerebral, de la gangrena y de la pérdida de función de extremidades¹. Es un proceso degenerativo de origen multifactorial (hipercolesterolemia, hipertensión arterial, tabaquismo, hiperhomocisteinemia, diabetes, infecciones víricas o bacterianas,...)^{2,3} que se inicia durante la infancia, pero que no suele dar manifestaciones clínicas hasta la vida adulta. La lesión aterosclerótica afecta principalmente las arterias musculares de tamaño medio (coronarias, carótidas, arterias de las extremidades inferiores, etc) y en las fases más avanzadas se manifiesta clínicamente, bien por la oclusión total o parcial de la luz del vaso, comprometiendo el flujo sanguíneo, o bien por la rotura de las placas, produciendo trombosis, embolismos o aneurismas.

La hipótesis más aceptada acerca de la génesis de la aterosclerosis postula que la lesión endotelial constituye el paso inicial de los procesos que darán lugar a la ate-

rosclerosis. El endotelio es el órgano responsable de la homeostasis vascular y mantiene un equilibrio constante entre los procesos de trombosis-fibrinólisis y vasodilatación-constricción⁴. Los factores de riesgo cardiovascular pueden causar la disfunción endotelial: alteraciones funcionales del endotelio que contribuyen tanto en la patogénesis como en la progresión de la aterosclerosis, y constituyen el primer signo clínicamente demostrable del proceso aterosclerótico^{5,6}. Es posible evaluar la disfunción endotelial a través de la respuesta vasomotora frente a sustancias como acetilcolina o serotonina, que inducen la vasodilatación de la pared vascular sana, mediada por la síntesis de óxido nítrico en el endotelio. Sin embargo, cuando hay una disfunción endotelial, provocan una vasoconstricción paradójica, bien por estímulo directo sobre el músculo liso vascular, bien por la liberación de endotelina-1, o mediante el aumento de la sensibilidad a las catecolaminas. La supresión o el control adecuado de los factores de riesgo, restablece la normalidad de la respuesta vasomotora mediada por el endotelio.

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 113-121.

Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria.

Correspondencia:

J.A. Rodríguez García
Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular
Clínica Universitaria
Universidad de Navarra
31080 Pamplona

Aunque la disminución de los niveles de colesterol plasmático reduce el riesgo de enfermedad coronaria e incluso permite la regresión de las lesiones ateroscleróticas y la normalización de la función endotelial, existe gran variabilidad individual en la presentación clínica de la enfermedad coronaria, lo que demuestra su génesis multifactorial y la existencia de múltiples factores implicados en la respuesta arterial a la hipercolesterolemia.

En la hipercolesterolemia, además de aumentar los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y su relación frente a las lipoproteínas de alta densidad (LDL/HDL), se produce la modificación química de las LDL, fundamentalmente por oxidación en la superficie de las células endoteliales o macrófagos. Como resultado de la oxidación lipídica se produce la descomposición y fragmentación de los ácidos grasos, y se generan productos intermedios altamente reactivos como aldehídos, cetonas y derivados de oxicoolesterol. Las LDL oxidadas y sus derivados, además de alterar la expresión génica de las células de la pared vascular, presentan una actividad citotóxica para el endotelio^{7,10}.

Dado el papel destacado que parece desempeñar la modificación oxidativa de la LDL en la aterogénesis, se requieren diseños experimentales que intenten demostrar si es posible actuar sobre el proceso aterogénico a través de la inhibición de la oxidación¹¹. Algunos datos epidemiológicos y experimentales sugieren que la elevación de los niveles plasmáticos de vitamina E^{12,13} y la ingesta diaria de β -carotenos¹⁴ o de vitamina C¹⁵ pueden reducir la incidencia de la aterosclerosis¹⁶⁻¹⁸.

Asumiendo que la lesión endotelial, manifestada como disfunción endotelial y la activación monocitaria, constituye el inicio de los procesos que dan lugar al desarrollo de la arterioesclerosis y que las cifras elevadas de colesterol y, sobre todo, su modificación oxidativa, juegan un papel importante en el desarrollo de dicho proceso, la administración de antioxidantes podría inhibir o frenar significativamente el proceso aterosclerótico y normalizar la función endotelial en el modelo de la denudación arterial en el cerdo hipercolesterolémico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 46 cerdos miniatura de la raza Yucatán. Los animales se incluyeron en el estudio con 4 meses de edad y se mantuvieron en unidades de estabulación aisladas, con agua *ad libitum* y fotoperiodo artificial de 12 horas. Tras un periodo de adaptación de 72 horas, a cada animal se le extrajeron 40 ml de sangre para determinaciones analíticas basales, mediante punción percutánea de la vena femoral o yugular. El cuidado y manejo de los animales se realizó siguiendo el Real Decreto 223/1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y en la Directiva 86/609 del Consejo de Europa sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE, 1988; DOCE, 1986).

Diseño experimental

Los animales se distribuyeron en 3 grupos: 16 en el grupo de dieta normal, 16 en el grupo de dieta hipercolesterolémica y 14 en el grupo con dieta hipercolesterolémica suplementada con vitaminas C y E. Los animales incluidos en el grupo control (NC) se alimentaron únicamente con pienso porcino estándar (Porcisansders C-02, Sanders, España); los del grupo hipercolesterolémico (HC) se alimentaron con la mezcla: 64% de pienso porcino estándar (Porcisansders C-02, Sanders), 30% de sebo animal, 4,5% de colesterol (Roig Farma, Tarrasa, España) y 1,5% de bilis de buey polvo (Roig Farma); los animales del grupo hipercolesterolémico con antioxidantes (HCV) recibieron la misma dieta que los del grupo HC, pero suplementada con 1.000 UI/día de vitamina E (Roig Farma) y 1 g/día de vitamina C (Roig Farma), esta suplementación se inició una semana antes de la primera intervención y se mantuvo hasta el sacrificio.

A todos los animales se les practicó una intervención tras 4 semanas de dieta, con distintos intervalos de tiempo hasta el sacrificio: 3, 7, 14 y 28 días. De este modo, en cada grupo se establecieron cuatro subgrupos: 3, 7, 14 y 28 días.

Protocolo experimental

Cada animal se mantuvo en ayunas, con agua *ad libitum* 24 horas previas a la intervención. Tras sedarlo y anestesiarlo se canularon la vena yugular (interna o externa) y la arteria carótida derechas. Tras la extracción de sangre arterial para las determinaciones analíticas y la inyección de un *bolus* intravenoso de heparina IV (10.000 U), se canuló la arteria iliaca interna izquierda con un catéter guía Judkins 7F. Utilizando una guía de angioplastia de 0,014", se avanzó un catéter Doppler 3F de 20 MHz (NuVel, NuMed Inc, Hopkinton, New York, USA) conectado a un velocímetro doppler (Millar MDV-20, Millar Instruments, Houston, Texas, USA) y se colocó a unos 2 ó 3 cm del extremo distal del catéter guía, en una zona de la arteria iliaca interna izquierda (AIII) sin ramificaciones. El catéter guía se retiró después a la aorta descendente. La velocidad del flujo arterial (velocidad máxima instantánea y velocidad media) se registró de forma continua, en un registrador gráfico (Model 78172A, Hewlett-Packard, USA), a lo largo de todo el protocolo. Se permitió a los animales un periodo de equilibrio para asegurar la estabilidad de las medidas, y se perfundió selectivamente la AIII con 4,8 ml de suero glucosado al 5% (Baxter, Valencia) por el lumen distal del catéter doppler, durante 2 minutos. De forma similar se inyectaron 2,4 ml de acetilcolina (AC) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) a concentraciones de 10^6 , 10^5 y 10^4 mol/l empleando un minuto para cada concentración. Al final de las inyecciones de AC se inyectó 1 mg de nitroglicerina (Beren-guer-Infale, Barcelona) por la misma vía. Tras cada inyección, se dejaban 5 minutos de reposo, para que la velocidad del flujo retornase a los valores basales.

Los registros gráficos se digitalizaron con una cámara de vídeo (Sony DXC-151 AP, Japón) y se procesaron con el programa Optimas 5.2 (Optimas Corp, Washington, Estados Unidos) para obtener la velocidad media de flujo en cada periodo. Los resultados se expresaron como variación de la velocidad media de flujo respecto a la velocidad media del flujo basal (en %).

Angiografía y angioplastia

Se realizaron angiografías ilíacas en la primera intervención, tras las mediciones

de velocidad de flujo, y en la segunda intervención, antes del sacrificio. Se inyectaron 25 ml de contraste iónico (Pielograf 70%, Juste, Madrid, España) antes de la bifurcación iliaca, con un inyector automático (Angiomat 3000 Viamonte Hobbs, Liebel Flarsheim, USA). La imágenes se registraron en video S-VHS (AG7350, Panasonic, Japón).

La lesión del endotelio se realizó en la primera intervención, tras la angiografía, mediante el inflado de un balón de angioplastia sobre las porciones medias de las arterias ilíacas interna y externa derechas. El diámetro de los balones se escogió de forma que la relación diámetro del balón/diámetro de la arteria fuera superior a 1,2. Se realizaron 3 inflados de 30 segundos en cada arteria, dejando unos 30 segundos de reposo entre cada inflado. Se realizaron grabaciones en vídeo del primer y del último inflado del balón.

Sacrificio y extracción de muestras

Los animales se sacrificaron con una inyección letal endovenosa de 80 mEq de cloruro potásico. Se realizó una laparotomía media y se extrajo el árbol iliaco en bloque, incluido el segmento distal de la aorta abdominal, se perfundió con paraformaldehído (4% en PBS) a 4 °C durante 15 minutos, a una presión de 100 cm de agua, y se sumergió en 500 ml de paraformaldehído (4% en PBS) a 4 °C durante 4 horas.

Determinaciones analíticas

Los valores de hemoglobina, hematocrito, recuento leucocitario y plaquetar, volumen plaquetar medio y volumen corpuscular medio eritrocitario se determinaron en un contador automático Coulter STKS (Coulter Inc., Hialeah, Florida, USA). Las determinaciones de lípidos (colesterol total, HDL y triglicéridos) se realizaron en suero, en un analizador automático Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Germany). El cálculo del colesterol asociado a LDL (col-LDL) se realizó mediante la fórmula de Friedewald¹⁹ modificada de acuerdo con la relación masa de colesterol/masa de triglicéridos de las proteínas de muy baja densidad (col-VLDL) porcinas (8:1): $\text{col-LDL}(\text{mg}/100\text{ml}) = \text{col-total} - (\text{col-HDL} + \text{Triglicéridos}/8)$.

La actividad PAI-1 plasmática se determinó con el ensayo amidolítico-sustratos cromogénicos (Coatest PAI, Chromogenix, Sweden). El fibrinógeno se determinó por el método coagulativo de Clauss.

Procesamiento de tejidos

Tras diseccionar el árbol ilíaco en bloque, incluyendo el segmento distal de la aorta abdominal, se perfundió con paraformaldehído (4% en PBS) a 4 °C durante 15 minutos, a una presión de 100 cm de agua, y se sumergió en 500 ml de paraformaldehído (4% en PBS) a 4 °C durante 4 horas. Las arterias se cortaron en segmentos de 1 cm de largo y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de 3 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tinción de elásticas de Van Gieson y tricrómico de Masson.

Análisis estadístico de datos

Los resultados numéricos obtenidos se presentan como la media aritmética ± error típico. En las comparaciones de tres o más grupos se utilizó el análisis de la varianza de un criterio (ANOVA 1) o el test de Kruskal Wallis. Para las comparaciones de dos grupos (independientes) se utilizaron los test de t Student o el test Mann Whitney, y (dependientes) el test de comparaciones pareadas o el test de Wilcoxon.

RESULTADOS

Edad y peso

La edad media de los animales al llegar al laboratorio fue de 3,6±0,4 meses. De los 46 animales que comenzaron el estudio todos los supervivientes aumentaron de peso de forma significativa. Este incremento fue constante y uniforme, sin que se encontrasen diferencias estadísticamente significativas entre los animales NC, HC y HCV.

Análisis hematológicos y bioquímicos

La mayoría de los parámetros hematológicos determinados ofrecieron valores similares para todos los grupos, tanto en las muestras basales como en la primera intervención y en el momento del sacrificio (Tabla 1). Sólo se observaron diferencias en el volumen plaquetar medio, que era mayor en los grupos HC y HCV que en el control. En la primera intervención los HCV presentaron un volumen plaquetar medio inferior a los HC.

Perfil lipídico

En el grupo NC no se observaron variaciones significativas en la concentración plasmática de las fracciones lipídicas a lo largo del estudio, y mostró unos valores semejantes a las determinaciones basales (Fig. 1). En los animales pertenecientes al

Tabla 1. Resumen de las principales determinaciones hematológicas. BASAL, muestras obtenidas en el inicio del experimento; 1ª INT, muestras de la primera intervención; SACRIF, muestras obtenidas antes del sacrificio. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control e hipercolesterolémico se señalaron: * (P<0,05), ** (P<,01). Entre los grupos hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con vitaminas C y E se señalaron: † (P<0,05).

Grupo	Peso	Leucocitos	Neutrófilos	Eritrocitos	Plaquetas	Vol. plaq. medio
BASAL	31,4±1,6	17,5±0,7	37,8±1,5	7,4±0,1	335,2±24,0	9,6±0,2
1ª Int.						
C	49,8±2,0	12,6±0,7	29,8±3,6	6,0±0,1	330,9±18,7	9,5±0,2
HC	53,6±2,4	13,9±0,9	30,0±3,3	6,0±0,2	375,9±17,3	8,7±0,2*†
HCV	50,5±3,6	16,0±1,3	36,7±3,2	5,9±0,1	408,2±21,4	8,0±0,1**
SACRIF.						
C	50,6±1,8	13,9±0,9	37,4±4,5	5,6±0,2	363,7±23,5	9,2±0,2
HC	55,2±2,2	15,3±0,8	38,0±3,4	5,7±0,2	398,5±24,5	8,6±0,2*
HCV	53,0±3,5	15,9±1,3	36,5±2,6	5,9±0,2	379,4±17,8	8,3±0,1**

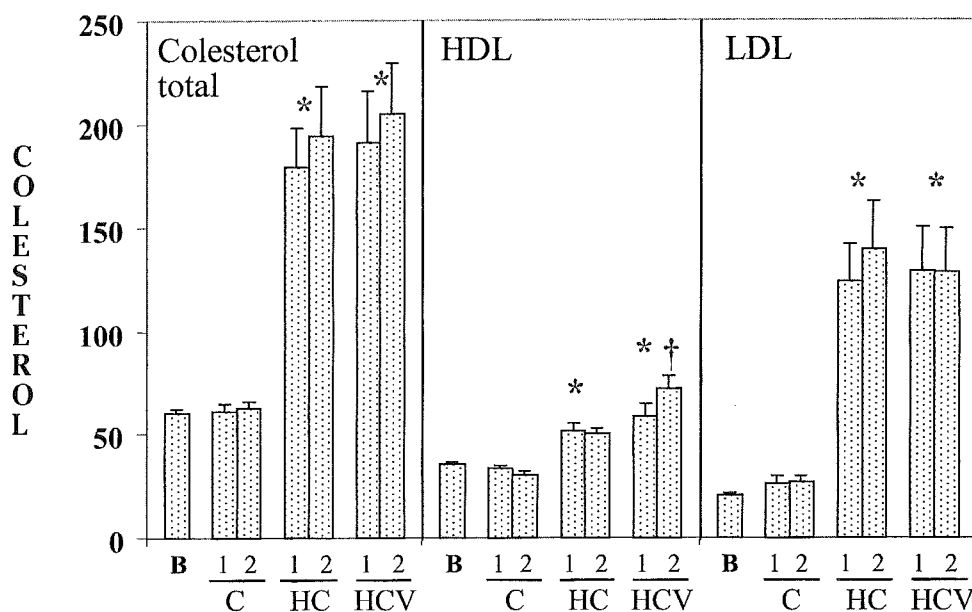


Figura 1. Perfil lipídico plasmático a lo largo del experimento. B, muestras obtenidas en el inicio del experimento; 1, muestras de la primera intervención; 2, muestras obtenidas antes del sacrificio. C, grupo control; HC, grupo hipercolesterolémico; HCV, grupo hipercolesterolémico con vitaminas C y E. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control e hipercolesterolémico se señalaron: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$). Entre los grupos hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con vitaminas C y E se señalaron: † ($P < 0,05$).

grupo HC se observó un aumento significativo de la concentración de colesterol total y del LDL-colesterol respecto del grupo NC, tanto en la primera intervención como en el sacrificio. Lo mismo ocurrió entre los grupos NC y HCV.

Entre el grupo HC y el grupo HCV no hubo diferencias en cuanto a la concentración plasmática de colesterol total. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol-HDL en el momento de la segunda intervención. La concentración de triglicéridos no varió de forma significativa a lo largo del estudio en ninguno de los dos grupos.

Velocidad de flujo arterial

La respuesta vasomotora de la AII (Fig. 2) en el grupo HC se encontró significativamente disminuida respecto al grupo NC, para las tres concentraciones de AC (10^{-4} M,

10^{-5} M y 10^{-6} M, $P < 0,05$). El grupo HCV presenta una respuesta de vasodilatación frente a la AC similar al la del grupo NC. La respuesta vasomotora a la nitroglicerina, que es independiente del endotelio, fue similar en los tres grupos.

PAI-1 y fibrinógeno

La actividad PAI-1 plasmática en NC ($28,1 \pm 0,8$ U/ml), HC ($28,4 \pm 0,7$ U/ml) y HCV ($27,0 \pm 0,8$ U/ml) se incrementó significativamente después de la angioplastia: $35,3 \pm 1,5$ U/ml ($p < 0,01$), $36,8 \pm 1,5$ U/ml ($p < 0,01$) y $33,4 \pm 1,3$ U/ml ($p < 0,01$), respectivamente.

La cantidad de fibrinógeno plasmática en NC ($384 \pm 21,8$ mg/dl), HC ($285 \pm 9,7$ mg/dl) y HCV ($327 \pm 21,0$ mg/dl) se incrementó significativamente después de la angioplastia: $382 \pm 22,7$ mg/dl ($p < 0,01$), $367 \pm 16,8$ mg/dl ($p < 0,01$) y $336 \pm 21,1$ mg/dl ($p < 0,01$), respectivamente.

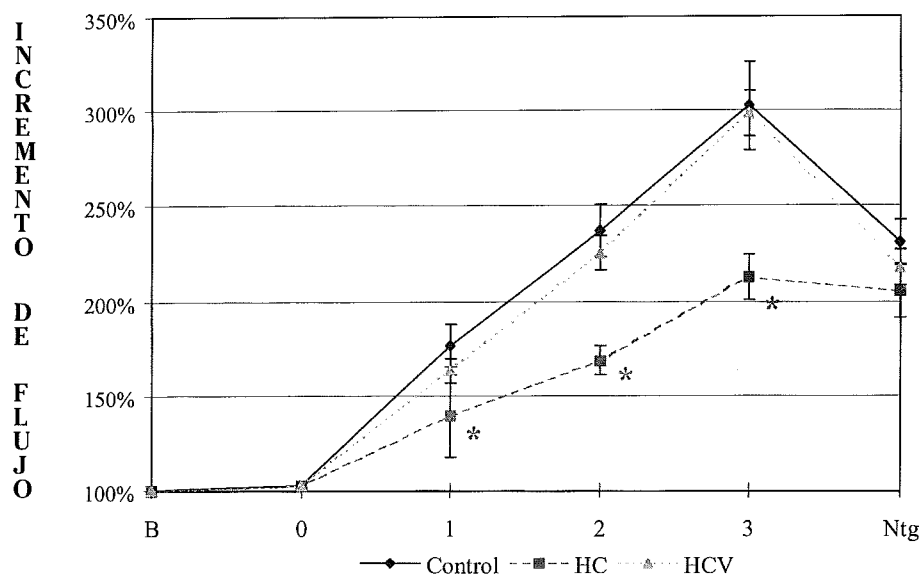


Figura 2. Respuesta vasomotora a la acetilcolina en la arteria iliaca interna. B, basal (sin infusión); 0, tras la infusión de suero fisiológico; 1, infusión de acetilcolina 10^{-6} M; 2, acetilcolina 10^{-5} M; Ntg, tras la infusión de nitroglicerina. C, grupo control; HC, grupo hipercolesterolémico; HCV, grupo hipercolesterolémico con vitaminas C y E. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control e hipercolesterolémico se señalaron: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$). No hubo diferencias entre los grupos hipercolesterolémico e hipercolesterolémico tratado con vitaminas C y E.

DISCUSIÓN

En este estudio se escogió el modelo porcino por su mayor similitud con el humano en la patofisiología de la aterosclerosis²⁰ en comparación con otros modelos, como el ratón²¹, la rata²² y el conejo²³. Los objetivos propuestos fueron: reproducir en nuestras instalaciones el modelo de hipercolesterolemia porcina; estudiar si la administración de vitaminas C y E altera el perfil lipídico hipercolesterolémico; determinar si la hipercolesterolemia afecta la función endotelial en este modelo y si los antioxidantes pueden alterar su efecto y observar si las vitaminas C y E alteran o reducen el desarrollo de lesiones vasculares inducidas por dilatación con balón.

La observación de los perfiles lipídicos plasmáticos confirma la obtención de un buen modelo de hipercolesterolemia porcina. La administración de la dieta hiper-

colesterolémica, similar a otras descritas previamente, se tradujo en un incremento significativo de los niveles plasmáticos de colesterol total y sus fracciones. Las concentraciones alcanzadas resultaron semejantes a las que se observan en la hipercolesterolemia humana moderada.

La suplementación de la dieta hipercolesterolémica con las vitaminas C y E no introdujo variaciones en los niveles de colesterol total ni en los de las LDL, pero elevó significativamente los niveles de HDL. Actualmente desconocemos tanto la causa como las posibles consecuencias de este efecto, que no había sido descrito previamente en este modelo animal. En humanos, aunque no hay estudios conclusivos, se han descrito este tipo de modificaciones con la vitamina C²⁴.

Tanto la dieta hiperlipidémica como la suplementación de esta con vitaminas C y

E no introdujeron cambios significativos en los parámetros hematológicos analizados, salvo el volumen plaquetar medio. Aunque en humanos el incremento del volumen plaquetar medio, observado en grupos de riesgo como diabéticos, fumadores y obesos, se han asociado con mayor incidencia de aterosclerosis y enfermedad coronaria^{25,26}, los resultados obtenidos concuerdan con los publicados anteriormente por este grupo de investigación²⁷ y observaciones en otros modelos animales^{28,29}.

La actividad PAI-1 plasmática en NC, HC y HCV se incrementó significativamente después de la angioplastia ($P < 0,01$). La tendencia a que los niveles de plasmáticos de PAI-1 en el grupo NC y el HCV retornen a la normalidad antes que en el HC sugiere que los niveles altos de colesterol favorecen el establecimiento de un estado pro-coagulante, que sería devuelto a la normalidad con las vitaminas C y E. Aunque el hecho de que la hipercolesterolemia induce la disfunción endotelial se ha comprobado en humanos^{30,32} y modelos animales^{33,34}, aún no se conocen completamente los mecanismos fisiopatológicos de esta alteración. La reducción de la vasodilatación frente a las distintas concentraciones de AC en el grupo HCV confirma la existencia de una disfunción endotelial en la AII de los animales hipercolesterolémicos, que se revierte completamente al suplementar la dieta hipercolesterolémica con las vitaminas C y E.

En algunos modelos animales la disfunción endotelial inducida por la hipercolesterolemia puede revertirse con la administración del aminoácido arginina³⁵ o el cofactor tetrahidrobiopterina³⁶, lo que sugiere la existencia de deficiencias en la disponibilidad del sustrato o de los cofactores imprescindibles para la síntesis del NO. Algunas observaciones atribuyen la disfunción endotelial derivada de la hipercolesterolemia al incremento en la pared vascular de la producción del anión superóxido³⁷, que reacciona con el NO y reduce su biodisponibilidad³⁸, mientras que otras describen que las LDL oxidadas ejercen un efecto directo de regulación negativa de la expresión de la eNOS³⁹. Sin embargo, la existencia de otra serie de referencias

aportando datos contradictorios con las hipótesis anteriores^{40,41} refleja la complejidad del mecanismo de la disfunción endotelial derivada de la hipercolesterolemia.

El hecho de que los antioxidantes reviertan la disfunción endotelial en el modelo utilizado parece apoyar las hipótesis del anión superóxido y la reducción en la expresión de la eNOS, pero es necesario hacer estudios más detallados de la expresión de la eNOS en la pared arterial, en las tres situaciones experimentales propuestas. El diseño de experimentos *in vitro*, en cultivos celulares, utilizando lipoproteínas aisladas a partir de la sangre de estos animales también contribuirá al esclarecimiento de este fenómeno.

Todos los animales a los que se les realizó angioplastia presentaron lesiones histológicamente detectables en las arterias dañadas. Aunque parece que no hay diferencias en el número de lesiones entre los distintos grupos, es necesario realizar un estudio histológico e inmunohistoquímico detallado para caracterizar las placas de ateroma y dilucidar si existen diferencias en su composición, desarrollo temporal, etc., que puedan ser debidas a la hipercolesterolemia o la introducción de los antioxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.
2. STEINBERG D, WITZTUM JK. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *JAMA* 1990; 264: 3047-3052.
3. GRUNDY SM. Cholesterol and coronary heart disease. Future directions. *JAMA* 1990; 264: 3053-3059.
4. LERMAN A, BURNETT JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992; 86: 12-19.
5. LUSCHER TF. Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J* 1992; 13: 50-55.
6. LUSCHER TF, TANNER FC, DOHI Y. Age, hypertension and hypercholesterolaemia alter endothelium-dependent vascular regulation. *Pharmacol Toxicol* 1992; 70 (6 Pt 2): S32-39.
7. 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: 916-924.
8. WITZTUM JL, STEINBERG D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-1792.
 9. NAPOLI C, D'ARMIENTO-FP, MANCINI-FP, POSTIGLIONE A, WITZTUM JL, PALUMBO G et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2680-2690.
 10. WITZTUM JL. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993; 69 (Suppl): S12-S18.
 11. SASAHARA M, RAINES EW, CHAIT A, CAREW TE, STEINBERG D, WAHL PW et al. Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation? *J Clin Invest* 1994; 94: 155-164.
 12. REAVEN PD, KHOUW A, BELTZ WF, PARTHASARATHY S, WITZTUM JL. Effect of dietary antioxidant combination in humans: protection of LDL by vitamin E but not by b-carotene. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 590-600.
 13. WILLIAMS RJ, MOTTERAM JM, SHARP CH, GALLAGHER PJ. Dietary vitamin E and the attenuation of early lesion development in modified Watanabe rabbits. *Atherosclerosis* 1992; 94: 153-159.
 14. SHAIKH A, DAUGHERTY A, O'SULIVAN F, SCHONFELD G, HEINECKE JW. b-carotene inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1995; 96: 2075-2082.
 15. RETSKY KL, FREEMAN MW, FREI B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. *J Biol Chem* 1993; 268: 1304-1309.
 16. STEINBERG D. Antioxidant vitamin and coronary heart disease. *N Eng J Med* 1993; 328: 1487-1489.
 17. STAMPLER MJ, HENNEKENS CH, MAUSON JE, COLDITZ GA, ROSNER B, WILLETT WC. Vitamine E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Eng J Med* 1993; 328: 1444-1449.
 18. RIMM EB, STAMPFER MJ, ASCHERIO A, GIOVANNUCCI E, COLDITZ GA, WILLETT WC. Vitamine E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Eng J Med* 1993; 328: 1450-1456.
 19. FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
 20. SCHWARTZ RS, MURPHY JG, EDWARDS WD, CAMRUD AR, VLIETSTRA RE, HOLMES DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 1990; 82: 2190-2200.
 21. DILLEY RJ, SCHWARTZ SM. Vascular remodeling in the growth hormone transgenic mouse. *Circ Res* 1989; 65: 1233-1240.
 22. CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983; 49: 327-333.
 23. MULLER DWN, ELLIS SG, TOPOL EJ. Experimental models of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19: 418-432.
 24. CERNA O, RAMACSAI L, GINTER E. Plasma lipids, lipoproteins and atherogenic index in men and women administered vitamin C. *Cor-Vasa* 1992; 34: 246-254.
 25. BROWN AS, HONG Y, DE BELDER A, BEACON H, BEESO J, SHERWOOD R, EDMONDS M, MARTIN JF, ERUSALIMSKY JD. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 802-807.
 26. PIZZULLI L, YANG A, MARTIN JF, LUDERITZ B. Changes in platelet size and count in unstable angina compared to stable angina or non-cardiac chest pain. *Eur Heart J* 1998; 19: 80-84.
 27. GARCIA-BOLAO I, MERINO J, MARTINEZ A, GRAU A, ALEGRIA E, MARTINEZ-CARO D. Effect of hypercholesterolaemia on platelet growth factors. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 929-935.
 28. MARTIN JF, SLATER DN, KISHK YT, TROWBRIDGE EA. Platelet and megakaryocyte changes in cholesterol-induced experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 604-612.
 29. KRAUSE S, POHL A, POHL C, FINK S, RUHLING K, KATZEL R et al. *Ex vivo* investigation of blood monocyte and platelet behaviour in pigs maintained on an atherogenic diet. *Exp Toxicol Pathol* 1992; 44: 144-146.
 30. CHOWIENCZYK PJ, WATTS GF, COCKCROFT JR, RITTER JM. Impaired endothelium-dependent vasodilation of forearm resistance vessels in

- hypercholesterolaemia. *Lancet* 1992; 340: 1430-1432.
31. FLARANAN NA. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitro oxide activity. *Circulation* 1992; 85: 1927-1938.
 32. DREXLER H, ZEHER AM. Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia. *Hypertension* 1991; 18 (4 Suppl): 1190-1199.
 33. RAIJ L, NAGY J, COFFEE K, DEMASTER EG. Hypercholesterolemia promotes endothelial dysfunction in vitamin E- and selenium-deficient rats. *Hypertension* 1993; 22: 56-61.
 34. JORGE PA, OSAKI MR, DE ALMEIDA E, CREDIDIO NETO L, METZE K. Effects of vitamin E on endothelium-dependent coronary flow in hypercholesterolemic dogs. *Atherosclerosis* 1996; 126: 43-51.
 35. ROSSITCH E, ALEXANDER E, BLACK PM, COOKE JP. L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1991; 87: 1295-1299.
 36. STROES E, KASTELEIN J, COSENTINO F, ERKELENS W, WEVER R, KOOMANS H, LUSCHER T, RABELINK T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997; 99: 41-46.
 37. OHARA Y, PETERSON TE, HARRISON DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551.
 38. GRYGLEWSKI RJ, PALMER RM, MONCADA S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320: 454-456.
 39. LIAO JK, SHIN WS, LEE WY, CLARK SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270: 319-324.
 40. GARCIA CE, KILCOYNE CM, CARDILLO C, CANNON RO, QUYYUMI AA, PANZA JA. Evidence that endothelial dysfunction in patients with hypercholesterolemia is not due to increased extracellular nitric oxide breakdown by superoxide anions. *Am J Cardiol* 1995; 76: 1157-1161.
 41. HIRATA K, MIKI N, KURODA Y, SAKODA T, KAWASHIMA S, YOKOYAMA M. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76: 958-962.