

Efecto de la vitamina C, sobre la actividad de glutathion peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica

Figueira Leticia¹, González Julio C.^{1,2,*}

Recibido: 30 Octubre 2009; Aceptado: 12 Enero 2010; Publicado: Mayo 2010

RESUMEN

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en la aterosclerosis; de hecho existe evidencias que indican que los antioxidantes son moléculas capaces de retardar y/o revertir el proceso aterosclerótico. El objetivo del presente estudio fue comparar el efecto de la Vitamina C (Vit C), sobre la actividad de la Glutathion peroxidasa (GPx) y la formación de ateromas en conejos. Se estudiaron 36 conejos divididos en 3 grupos: Grupo1 (Control): conejarina, Grupo2: huevo y conejarina, Grupo 3: huevo, conejarina y Vit C (100 mg/diarios). El período experimental duró 12 semanas. Se determinó perfil lipídico por métodos enzimáticos y la actividad de GPx por cinética en 0 y 12va semana. Los conejos fueron sacrificados y se les realizó estudio histológico de su aorta. Los resultados revelaron un incremento en la actividad de la GPx en los grupos 2 y 3 con respecto al control en la 12va semana de experimentación ($p < 0,05$). Hubo inhibición de lesiones ateroscleróticas en los conejos del grupo 3. En conclusión en condiciones de hiperlipidemia con o sin suplementación de Vit C, existe incremento en la actividad de GPx. Por otra parte, la Vit C disminuye y evita la progresión de ateromas.

Palabras claves: Estrés oxidativo, Vit C, GPx, aterosclerosis.

Effects vitamin C, on glutathione peroxidase activity and atheroma formation, in rabbits exposed to a hyperlipidaemic diet

SUMMARY

Oxidative stress plays an important role in atherosclerosis; so antioxidants are molecules have been used to slow down or inhibit atherosclerosis. The objective of the present study was to compare the effect of Vitamin C (Vit C), on serum Glutathione peroxidase activity (GPx) and on the formation of aortic lesions in rabbits. 36 rabbits were studied: Group1: "conejarina" (commercial rabbit food); Group2: egg and conejarina, Group3: egg, conejarina and Vit C (100mg/day). The experiment lasted 12 weeks. Lipid profile was done by enzymatic methods and GPx by kinetic method in weeks 0 and 12. Histological study of rabbit's aorta was done. GPx activity in groups 2 and 3, increased compared with controls, from week 12 of experimentation ($p < 0,05$). There was inhibition of aortic lesions in groups 3. In conclusion, under hyperlipidaemic conditions, with or without Vit C supplementation, activity of GPx there is increased. Vit C reduces and prevents the progression of atheromas

Key words: Oxidative stress, Vit C, GPx, atherosclerosis.

* Solicitar copia a: jgonzal@ucv.edu.ve.

1. Laboratorio de investigaciones del postgrado de la Escuela de Bioanálisis..

2. Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas (CIMBUC); Facultad de Ciencias de la Salud; Universidad de Carabobo, Valencia – Venezuela.

Introducción

Los radicales libres son especies químicas, altamente reactivas e inestables que tienen en su estructura atómica uno o más electrones no apareado en su última capa (1). Entre los radicales libres, se encuentran el radical hidroxilo, anión superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, ácido hipocloroso, peroxinitrito, entre otros, los cuales pueden ser generados en el organismo como resultado del metabolismo aerobio (2). La incrementada generación de estas moléculas o iones puede causar daño oxidativo a diversas moléculas como lípidos, proteínas y ADN, lo cual puede llevar a enfermedades crónicas como la aterosclerosis (3-5).

La aterosclerosis es una enfermedad crónica inmuno inflamatoria, caracterizada por un endurecimiento y pérdida de elasticidad de la pared arterial; así como un estrechamiento del lumen arterial, que afecta principalmente a las arterias de mediano y gran calibre. Este proceso se inicia desde la infancia y la adolescencia (6-8). Es conocido que las consecuencias clínicas de esta enfermedad, son causa de elevada mortalidad en diferentes países, siendo las enfermedades cardiovasculares la principal causa de muerte en nuestro país (9). Actualmente existe suficientes evidencias que indican que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el proceso aterosclerótico (10-13).

La susceptibilidad del endotelio vascular al daño oxidativo es una función que va a depender del balance entre el grado de estrés oxidativo y la capacidad de defensa de los antioxidantes (5,14,15); por lo tanto los antioxidantes son un sistema de defensa, al daño oxidativo producido por los radicales libres. Los antioxidantes son clasificados como exógenos (naturales o sintéticos) o endógenos, ambos son responsables de la remoción de los radicales libres. Los antioxidantes naturales son clasificados en dos grupos: enzimático y no enzimático. Los antioxidantes enzimáticos incluyen a la catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), entre otros. Entre los antioxidantes no enzimáticos, se encuentran el ácido ascórbico, polifenoles, entre otros (1,16-18).

La Vitamina C (Vit C) o ácido ascórbico es un antioxidante de naturaleza hidrosoluble, que actúa mediante la remoción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (19-21). Asimismo, la Vit C es capaz de regenerar otras moléculas antioxidantes como á-tocoferol, glutatión, urato, á-caroteno. Por otra parte, se ha evidenciado que el ascorbato es uno de los principales antioxidantes que neutraliza directamente a los radicales libres (22,23). Y en estudios *in vivo* se ha demostrado que es capaz de disminuir la progresión de la aterosclerosis (12).

Por su parte, la GPx es un término que describe a una familia de enzimas (EC 1. 11. 1. 9.), que tienen actividad peroxidasa.

Por lo que, la GPx es una proteína de naturaleza enzimática que contiene selenio, y que se encarga de reducir el peróxido de hidrógeno y una amplia gama de hidroperóxidos orgánicos en sus correspondientes alcoholes, requiriendo glutatión como cofactor, y de igual manera oxida el glutatión a glutatión disulfido (24-26). La actividad de esta enzima se está investigando como marcador biológico de patologías como la aterosclerosis (12,27). Asimismo, se han descrito disminución de la actividad de esta enzima en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo la enfermedad coronaria (28).

Por lo tanto, tomando en cuenta que el estrés oxidativo está involucrado en la fisiopatología de la aterosclerosis, y que los efectos deletéreos de los radicales libres pueden ser prevenidos por la acción de los antioxidantes. En el presente estudio se evaluó el efecto que tiene la Vit C, sobre la actividad de la GPx y sobre la formación de ateromas en conejos macho Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica.

Materiales y Métodos

Muestra y diseño experimental

Se utilizaron 36 conejos macho raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1,350 – 1,400 Kilogramos, provenientes del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC, Caracas, Venezuela). Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (UC) (Valencia, Venezuela), los conejos fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos de 12 conejos. Cada conejo fue alimentado diariamente de la siguiente manera: Grupo 1 (control): 150 gramos de conejarina (Protinal®, Venezuela). Grupo 2: un huevo hervido y 150 gramos de conejarina. Grupo 3: un huevo hervido, 150 gramos de conejarina y 100 mg de Vit C (Merck). El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas.

Todos los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los procedimientos de cuidado de los animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (29). El experimento fue realizado rigurosamente según las normas éticas del Bioterio Central de la UC. Estos animales estuvieron bajo la vigilancia del personal del bioterio a lo largo del estudio.

Análisis químico de los alimentos

Conejarina G granulada marca Protinal®: Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B₂, B₁₂, C, D₃, E, ácido

pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

Huevo (30): Cada huevo contiene aproximadamente 300 mg de colesterol en su yema. El porcentaje de colesterol en cada ración de alimento para los grupos 2 y 3 fue de 0,12%.

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca bajo anestesia a todos los conejos previo ayuno de 14 horas en la semanas 0 y 12va. Las muestras de suero fueron conservadas en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos colorimétrico directo (Wiener Lab, Argentina). El c-HDL, c-LDL se realizaron por extracción y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). La actividad de la GPx fue determinada por ensayo cinético (Cayman Chemical, EEUU).

Preparación de tejidos y tipificación histológica de las lesiones ateroscleróticas: Los conejos fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se procedió a realizar la autopsia de dichos animales, extrayendo la aorta para ser examinada. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10 % en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina-eosina (31), para luego ser observados por microscopía óptica. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association (32).

Análisis de los datos

Se calculó el promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se empleó la correlación de Pearson para relacionar el perfil lipídico con los niveles de la actividad de la GPx. Se utilizó el análisis de varianza para comparar los valores de las variables sujetas a estudio, empleando el análisis de Kruskal – Wallis para comparar grupos independientes y el análisis de Friedman para comparar grupos relacionados, y una tabla de asociación para clasificar el grado de ateroma. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa Statistix versión 8.

Resultados

No se encontraron diferencias significativas en los pesos basales entre los grupos de conejos sujetos a estudio. En la 2da, 4ta, 6ta, 8va, 10ma y 12va semana de experimentación hubo un incremento significativo en el peso de los conejos de los grupos 2 y 3 con respecto al grupo 1, y con respecto a sus pesos basales ($p < 0,05$). Los conejos del grupo 1 aumentaron de peso a lo largo del estudio. Asimismo, no se encontraron

diferencias en los pesos de los conejos entre los grupos 2 y 3 a lo largo del experimento (Datos no mostrados).

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de CT, c-HDL, c-LDL y TG basales entre los grupos de conejos sujetos a estudio. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en el grupo 1 permanecieron sin cambios significativos a lo largo del experimento. Al final del estudio se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en los grupos 2 y 3 con respecto al grupo 1. Asimismo, para los grupos 2 y 3 los valores de CT, c-HDL, c-LDL y TG variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio y desviación estándar del perfil lipídico.

Variables (mg/dL)	Semana Cero		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Colesterol	88 ± 8 A	91 ± 11 A	87 ± 9 A
C-HDL	28 ± 4 A	28 ± 3 A	30 ± 2 A
C-LDL	52 ± 6 A	55 ± 4 A	57 ± 6 A
Triglicéridos	90 ± 12 A	88 ± 9 A	88 ± 10 A
Variables (mg/dL)	Semana Doce		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Colesterol	83 ± 9 A	1072 ± 167 B	1073 ± 130 B
C-HDL	28 ± 4 A	72 ± 10 B	71 ± 12 B
C-LDL	53 ± 4 A	996 ± 150 B	913 ± 147 B
Triglicéridos	88 ± 10 A	159 ± 16 B	155 ± 21 B
Variables (mg/dL)	Valores p		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Colesterol	0,2411	0,0025	0,0025
C-HDL	0,7671	0,0025	0,0025
C-LDL	0,3066	0,0025	0,0025
Triglicéridos	0,9687	0,0025	0,0025

Las medias de los grupos en cada semana con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Análisis de Kruskal – Wallis. $p < 0,05$

Valores p: Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales. Análisis de Friedman. $p < 0,05$.

En cuanto a la GPx, no se observaron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre los grupos sujetos a estudio en el inicio del experimento. Asimismo, no se observó diferencias significativas en los niveles de GPx en el grupo 1 al inicio y final del estudio. Para la 12va semana, se observó que la actividad de la GPx en los grupos 2 y 3 difieren de los encontrados en el grupo 1. Asimismo para los grupos 2 y 3, los valores de la actividad de GPx variaron al final de la investigación con respecto a sus valores basales ($p < 0,05$). (Tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de la actividad de la GPx.

Semana Cero						
Variables	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
GPx (nmol/min/mL)	70,33	+ 3,80 A	71,33	+ 13,37 A	74,50	+ 11,78 A
Semana Doce						
Variables	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
GPx (nmol/min/mL)	73,18	+ 6,70 A	128,53	+ 14,56 B	117,10	+ 14,09 B
Valores p						
GPx	0,1078		0,0025		0,0025	

Las medias de los grupos en cada semana con diferentes letras son estadísticamente diferentes. Análisis de Kruskal – Wallis. $p < 0,05$.

Valores p: Comparación de cada grupo con respecto a sus valores basales. Análisis de Friedman. $p < 0,05$.

No se observó asociación significativa entre las variables sujetas a estudio en los diferentes grupos de conejos al inicio y final del estudio.

En cuanto a los cortes histológicos en las aortas, se observó que ningún conejo del grupo 1 evidenció lesiones ateroscleróticas (Tabla 3). Todos los conejos del grupo 2 evidenciaron lesiones de tipo III y IV (Figura 1). Por su parte, algunos conejos del grupo 3 no presentaron lesiones y otros evidenciaron lesiones de grado variable (Figura 2).

Tabla 3. Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta.

GRUPO	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Tipo VI
1	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0 (0%)	0 (0%)
3	4 (33,3%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Figura 1. Corte histológico de la aorta de un conejo perteneciente al grupo 2. Se observa en la íntima arterial abundantes cúmulos de lípidos intracelulares (flechas blancas) y extracelulares (flecha negra). Lesión Tipo IV. Tinción hematoxilina–eosina. 100X.

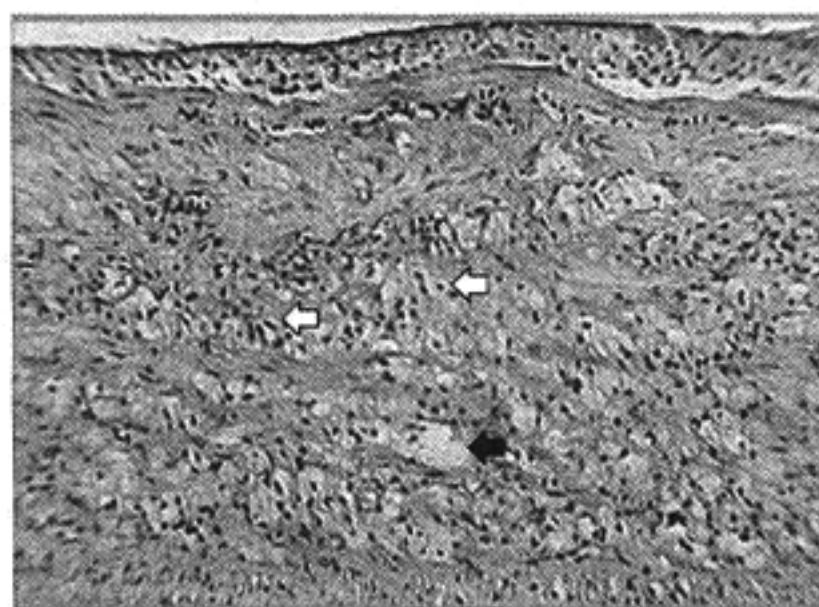
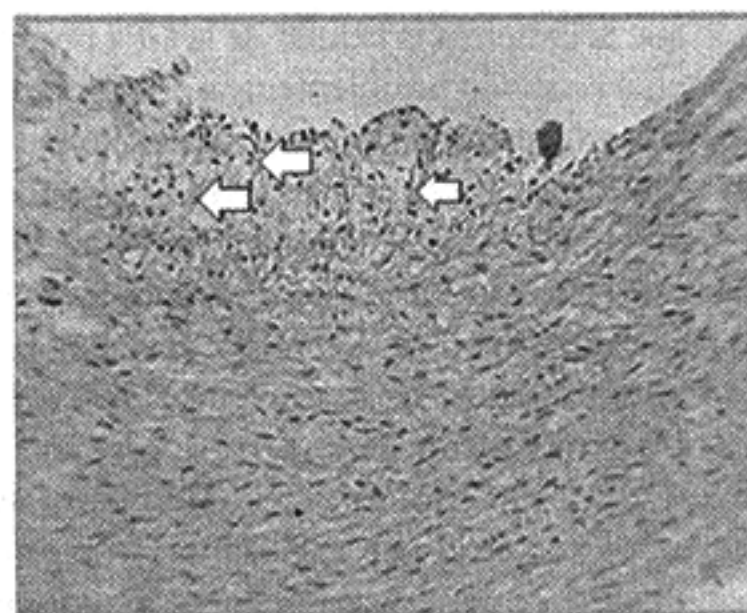


Figura 2. Corte histológico de la aorta de un conejo perteneciente al grupo 3. Se observa en la íntima arterial cúmulos de células espumosas con lípidos intracelulares (Flechas). Lesión Tipo II. Tinción hematoxilina–eosina. 50X.



Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la Vit C sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas en conejos; evidenciándose que al inicio del experimento todos los grupos de conejos fueron semejantes entre sí, pues no se observaron diferencias en las variables estudiadas.

En cuanto al peso de los conejos, se pudo apreciar que todos los conejos aumentaron de peso a lo largo del estudio, tal y como se ha reportado previamente (12,13,33); esto es debido a que los mismos son conejos jóvenes que estaban en período de crecimiento.

Asimismo se pudo observar que la dieta suministrada a los grupos 2 y 3 fue hiperlipidémica; ya que la concentración sérica de CT y TG en la 12va semana de estudio en estos grupos aumentó, tal y como lo hemos reportado en otros estudios (12,13,33); esto pudo ser debido a que los conejos no pueden incrementar la excreción de esteroides (34,35), incrementándose de esta manera su perfil lipídico. Asimismo, es importante destacar que la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia no se evitó a pesar del consumo de antioxidantes (Vit C), lo cual ha sido previamente reportado (12,34).

La falta de suplementación de antioxidantes, así como la hipercolesterolemia, ha estado relacionada con un incremento en la oxidación de LDL (10,36). Para combatir el estado de estrés oxidativo, el organismo cuenta con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los mecanismos enzimáticos incluyen la GPx (27). Esta enzima representa la principal línea de defensa antioxidante en células de mamíferos (37).

En el presente estudio se pudo observar que la actividad de la GPx en los grupos 2 y 3 estuvo incrementada con respecto al grupo 1; esto pudo ser ocasionado por la dieta hiperlipidémica que consumieron los conejos pertenecientes a estos grupos, ya que la hiperlipidemia es capaz de ocasionar un estado de estrés oxidativo (38).

Se ha observado que la deficiencia celular de la GPx promueve disfunción endotelial asociado posiblemente a estrés oxidativo (39), por su parte la expresión y actividad de esta enzima se incrementan ante un ambiente pro oxidante (40,41); tal y como lo reportamos en nuestro estudio; este incremento en la actividad puede obedecer a una medida de respuesta por parte del organismo para combatir el estrés oxidativo; ya que la GPx tiene un papel muy importante en la prevención del mismo, puesto que la expresión reducida de la enzima, incrementa la oxidación de las LDL en ratones (42). Asimismo se ha propuesto que la GPx podría ser una importante enzima antiaterogénica, debido a que su actividad está disminuida o ausente en placas ateroscleróticas; por lo que la falla de su

actividad en la placa parece encontrarse asociada con el desarrollo de lesiones más severas en humanos (43,44). Por otra parte, otros investigadores han demostrado que en pacientes con enfermedad coronaria existe una baja actividad de GPx, la cual está relacionada con el riesgo incrementado de los pacientes a sufrir eventos cardiovasculares; por lo que la inducción en la actividad de esta enzima podría disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares en estos pacientes (45).

Es importante tener en cuenta que a pesar de la administración de antioxidantes (Vit C), la actividad de la GPx, no evidenció cambios con respecto al grupo 2, demostrando que bajo las condiciones de nuestro estudio no hubo diferencias en la inducción de la actividad de la enzima entre los grupos 2 y 3; sin embargo, la administración de antioxidantes disminuyó el grado y la presencia de lesiones ateroscleróticas con respecto al grupo de conejos que no fueron suplementado y que se les administró lípidos en su dieta (grupo 2); sugiriendo que a pesar de no existir diferencias en la actividad de la GPx (defensa antioxidante) entre estos grupos de conejos, posiblemente existe una menor concentración de marcadores de oxidación, como la LDLox, en los conejos suplementados con antioxidantes, como ya lo hemos reportado previamente (12,13).

El estrés oxidativo ha sido implicado como un importante factor etiológico en la aterosclerosis; de hecho los antioxidantes pueden disminuir la aterogénesis y mejorar la función vascular; ya que son capaces de disminuir la oxidación de las LDL, disminuyen la producción de radicales libres en la pared arterial, inhiben la activación endotelial (expresión de moléculas de adhesión celular, moléculas quimioatrayentes, entre otros) y mejoran la actividad biológica del óxido nítrico derivado del endotelio (1-8,10,11,18-23).

En cuanto a la formación de lesiones ateroscleróticas, se pudo apreciar que la dieta administrada a los conejos con lípidos, fue aterogénica, pues indujo lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado en los conejos que consumieron únicamente esta dieta; por su parte, como era de esperar los conejos del grupo 1, no evidenciaron lesiones, pues no consumieron una dieta rica en lípidos; estos resultados coinciden con los reportados previamente (12,13,33,35).

Por su parte, la administración de Vit C en la dieta de los conejos del grupo 3, logró disminuir la formación y el grado de las lesiones ateroscleróticas, ya que la mayor parte de estos conejos no evidenciaron lesiones, o tuvieron lesiones de grado leve o medio, demostrando que la Vit C es efectiva en disminuir la formación y progresión de lesiones en conejos sometidos a dieta hiperlipidémica bajo nuestras condiciones de estudio, tal y como ha sido reportado previamente (12).

La acción antiaterogénica de la Vit C observada en nuestro estudio, pudo ser debida a sus efectos antiinflamatorios, además de sus efectos antioxidantes; ya que la Vit C inhibe la disfunción celular, la liberación de IL-6 y moléculas de adhesión celular (19). Asimismo, la Vit C es uno de los antioxidantes más potentes, que en concentraciones fisiológicas es capaz de inhibir las modificaciones oxidativas de las LDL *in vivo* (46); así como de revertir la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad coronaria arterial (47). Es importante tener en cuenta que la Vit C es un antioxidante efectivo por varias razones, ya que tanto el ascorbato como el radical ascorbilo tienen bajos potenciales de reducción y pueden reaccionar con la mayoría de radicales y oxidantes relevantes biológicamente; por otra parte, el radical ascorbilo tiene baja reactividad, por lo que rápidamente puede ser convertido a ascorbato y ácido dehidroascórbico; adicionalmente el ascorbato puede ser regenerado desde el radical ascorbilo por mecanismos dependientes e independientes de enzimas (22). Por lo tanto, estas propiedades y acciones de la Vit C pueden sugerir una explicación al efecto beneficioso sobre la inhibición de la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas visto en nuestro estudio.

En conclusión se tiene que bajo condiciones de hiperlipidemia, en presencia o ausencia de antioxidantes, la actividad de la GPx se encuentra incrementada; sin embargo, la Vit C, fue efectiva en inhibir la formación y progresión de lesiones ateroscleróticas bajo nuestras condiciones de estudio.

Agradecimientos

El proyecto fue financiado por el Laboratorio Clínico Julio González. Agradecemos a María De Freitas y Manuel Dinis por su valiosa colaboración y ayuda, en la toma de muestra de sangre y en la disección de los conejos. Al Bioterio Experimental de la UC por facilitarnos las instalaciones para llevar a cabo el experimento. Y al Bioterio Central por su asistencia técnica.

Referencias

- Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options- *Curr Neuroparmacol* 2009; 7: 65-74.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344 (8924): 721-724.
- Yun-Zhong, F, Sheng Y, Guoyao Wu. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872- 879.
- Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary atherosclerosis. *Circ J* 2009; 73 (4): 595-601.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 2009; 73: 411 – 418.
- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets and Atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62 (10): 1161-1178.
- Holvoet P, De Keyser D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol*. 2008; 3(6): 637-649.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci*. 2009; 5 (5): 474-488.
- Ewald M, Campos G, Rivero F, Álvarez L, Torres E, Arocha P, Ryder E, Arteaga M, Vizcaino G, Fernández N. Factores hemostáticos de riesgo coronario en una población sana de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Invest Clín* 2003; 44: 21-30.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol*. 2009; 50 (5): 402-409.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 29-38.
- Figueira L, González J. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, vitaminas C y E sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 2008; 10: 593-607.
- González J, Figueira L, González D, Álvarez A, Aguilera C, Reigosa A. Niveles plasmáticos de Mieloperoxidasa y Proteína C Reactiva en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 2007; 10 (2): 86-90. Publicado en el 2009.
- Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of Oxidative Stress and Redox Regulation in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2009; 16: 1-7.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001; 40: 959-975.
- Heistad D, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009;73 (2): 201-207.
- Brambilla D, Mancuso C, Scuderi M, Bosco P, Cantarella G, Lempereur L, Di Benedetto G, Pezzino S, Bernardini R. The roles of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile *Nutr J* 2008; 7: 29-38.
- Berk BC. Novel approaches to treat oxidative stress and cardiovascular diseases. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2007; 118: 209-214.
- Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *PSEBM* 1999; 222: 196-204.
- Kojo S. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1041 – 1064.
- May J. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J* 1999; 13: 995-1006.
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a prooxidant under physiological conditions? *FASEB J* 1999; 13: 1007 – 1024.
- Aguirre R, May JM. Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther*. 2008; 119 (1): 96-103.
- Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2004; 109: 544 – 549.

25. Zhang Y, Handy D, Loscalzo J. Adenosine dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cell and protection against oxidative stress. *Cir Res* 2005; 96: 831 – 837.
26. Yegin A, Yegin H, Aliciguze Y, Deger N, Semiz E. Erythrocytes selenium glutathione peroxidase activity is lower in patients with coronary atherosclerosis. *Jpn Hert J* 1997; 38: 793 – 798.
27. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension*. 2004; 44: 381-386.
28. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Hornig B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium – dependent vasodilation. *Circulation* 2000; 101: 2264 – 2270.
29. Guide for the care and use of animals. 1996. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press, Washington DC, USA
30. Speziale A. El Laboratorio Clínico y la evaluación del riesgo coronario. *Rev Mex Patol Clin* 2000; 47: 202 – 218.
31. Luna L. The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 1968 Cap 1-4: 11-37. Editions McGraw-Hill. New York. USA.
32. Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 1995; 15: 1512 – 1531.
33. González J, Figueira L, Reigosa A. Selectina-E, VCAM-1, FNT-a, IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis, en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 2008; 12: 50-57.
34. Kolodgie F, Katocs A, Largis E, Wrenn J, Herderick E, Lee S, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low level cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1454 – 1464.
35. Bravo M, Armas F, Cabrera M, González J, Pelayo T, González D, Reigosa A. Administración parenteral de homocisteína y efecto del ácido fólico en la formación de ateromas en conejos. *Salus* 2002; 6: 23-29.
36. Stocker R, Keaney JF Jr. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb and Haemost*. 2005; 3: 1825-1834.
37. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann K, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53.
38. Mohd N, Ghafar N, Jaarin K, Khine J, Top G. Vitamin E and factors affecting atherosclerosis in rabbits fed cholesterol – rich diet. *Int J Food Sci Nutr* 2000; 51, S79 – S94.
39. Forgione M, Cap A, Liao R, Moldovan N, Eberhardt P, Lim C, Jones J, Goldschmidt P, Loscalzo J. Heterozygous cellular glutathione peroxidase Deficiency in the Mouse. *Circulation* 2002; 106: 1154 – 1158.
40. De Haan J, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea R, Cheung N, Bronson R, Silvestro M, Wild S, Zheng S, Beart P, Hertzog P, Kola I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1998; 273: 22528 –22536.
41. Cowan D, Weisel R, Williams W, Mickle D. Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 26904-26910.
42. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein C, Ho Y, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1131-1138.
43. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-516.
44. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore A, Napolitano A, Di Ilio C, Cuccurullo F. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 1930-1934.
45. Blankenberg S, Rupprecht H, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner K. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 1605-1613.
46. Jialal I, Vega G, Grundy S. Physiological levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82: 185 – 191.
47. Levine G, Frei B, Koulouris S, Gerhard M, Keaney J, Vita J. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 93: 1107 – 1113.