

Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis

M.A. Navarro, J.M. Arbonés, S. Acín, R. Carnicer, A.J. Sarría, J.C. Surra, C. Arnal, M.V. Martínez y J. Osada

Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y Celular y Patología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.

La presente revisión aborda el metabolismo lipoproteico comparado y la inducción de la aterosclerosis con sus controversias en varios modelos animales pertenecientes a un amplio espectro evolutivo que abarca desde los roedores (ratón, conejo, rata, hámster, cobaya), las aves (paloma), los cetartiodáctilos (cerdo) y los carnívoros (perro) hasta los primates (macacos, *Rhesus*, mono verde africano).

Palabras clave:

Arteriosclerosis. Modelos animales. Metabolismo lipoproteico.

EXPERIMENTAL ANIMALS USED AS MODELS IN ARTERIOSCLEROSIS RESEARCH

Current review presents an overview of the compared lipoprotein metabolism and atherosclerosis development and their controversies in several animal models covering a wide phylogenetic spectrum. Orders are rodents (mice, rabbits, rats, hamsters, guinea pigs), birds (pigeons), cetartiodactyla (pigs), carnivores (dogs) and primates (macaques, *Rhesus*, African green monkey).

Key words:

Arteriosclerosis. Animal models. Lipoprotein metabolism.

Trabajo financiado en parte por los proyectos FISS 01/0202, FEGA-FEOGA CAO99-014 y la Fundación Española del Corazón. M.A. Navarro es becario del FEGA-FEOGA.

Correspondencia: Dr. J. Osada.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza. España.
Correo electrónico: Josada@unizar.es

Recibido el 19 de diciembre de 2003 y aceptado el 31 de marzo de 2004.

Introducción

La aterosclerosis humana es un proceso multifactorial en el que están implicados factores genéticos y ambientales¹, y cuyo desarrollo acontece progresivamente en lugares específicos del entramado vascular. La búsqueda de los diversos factores implicados y el prolongado período de desarrollo requieren el auxilio de modelos animales que simulen, con mayor o menor éxito, el proceso humano y que ayuden a entenderlo. Hace ahora casi un siglo que científicos rusos² pusieron en marcha este enfoque experimental al inducir aterosclerosis en conejos. En el largo camino de experimentación recorrido, se han utilizado diferentes modelos animales y ha quedado bien establecida la conexión del metabolismo lipídico y la aterogénesis así como parte de sus mecanismos moleculares implicados; ello ha sido útil también para la especie humana. En muchos casos, el camino se ha realizado en sentido contrario; ante procesos de escasa incidencia en humanos, se precisaba encontrar un modelo animal para verificar una hipótesis o la eficacia de un tratamiento (sirva como ilustración el caso de la hipercolesterolemia familiar y el hallazgo del conejo Watanabe). La elaboración intelectual de la patogenia de la arteriosclerosis se ha ido perfilando a lo largo de este siglo y cada modelo ha aportado algunas de las claves necesarias para entender el fascinante, complejo y dinámico cuadro de la arteriosclerosis, que amenaza con tener tintes propios en cada localización donde se presente³.

El empleo de modelos animales para el estudio de la arteriosclerosis posee, como cualquier faceta de la actividad humana, ventajas e inconvenientes. Ningún modelo reproduce exactamente la situación humana, si es que existe una única situación humana de arteriosclerosis. Cada día se hace más patente que la enfermedad no es igual en los varones que en las mujeres y que, a su vez, hay cientos de variacio-

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los diferentes animales empleados para la investigación de la aterosclerosis

Animales	Ventajas	Desventajas
<i>Roedores</i> Cobaya	Metabolismo lipoproteínico semejante al humano, requiere vitamina C	Poco conocido y no bien estudiada la presencia de procesos ateroscleróticos más allá de la estría grasa
Conejo	Existen razas de animales carentes del receptor de LDL o hipertriglicéridémicos, tamaño adecuado, buena respuesta al colesterol dietético, ampliamente conocido, disponibilidad de líneas transgénicas	Localización de las lesiones diferente a la humana y con requerimientos dietéticos exagerados de colesterol para desarrollar la aterosclerosis, deficiencia de lipasa hepática, depósitos de colesterol en diversos órganos por su limitada capacidad para eliminarlo
Hámster	Metabolismo lipoproteínico semejante al humano, razas susceptibles para desarrollar aterosclerosis, buena respuesta al colesterol dietético	Poco conocido y no bien estudiada la presencia de procesos ateroscleróticos más allá de la estría grasa
Rata	Fácil obtención, tiempo de generación pequeño, fácil manejo y estabulación, existencia de razas con fenotipos dislipémicos	Muy resistentes a la aterogénesis, HDL altas, sin CETP, resistentes a la administración de colesterol dietético
Ratón	Genética muy bien definida, estirpes de alta consanguinidad, fácil obtención, tiempo de generación pequeño, fácil manejo y estabulación, procedimientos de transgenia muy desarrollados	Muy resistentes a la aterogénesis, HDL altas, sin CETP, dificultad para recoger muestras sanguíneas abundantes y para la disección de los vasos de mediano y pequeño tamaño
<i>Aves</i> Paloma	Razas susceptibles para desarrollar aterosclerosis, localización, histopatología y progreso de la lesión similar al humano, bajo coste y fácil manejo, tamaño adecuado y tiempo de generación pequeño, buena respuesta al colesterol dietético	No son mamíferos, carencia de Apo E, B ₄₈ y quilomicrones, el metabolismo proteínico varía en los períodos de puesta de huevos; la aterosclerosis parece asociada a viriasis
<i>Carnívoros</i> Perro	Similitud anatómica y funcional, perfil lipoproteínico bien caracterizado	Especie resistente al desarrollo de la aterosclerosis, elevados valores de HDL, caros, mala respuesta al colesterol dietético y conflicto ético
<i>Cetartiodáctilos</i> Cerdo	Similitud anatómica y funcional, aterosclerosis espontánea en la aorta abdominal, disponibilidad de animales más pequeños y de mutantes del metabolismo lipoproteínico	Requerimiento de dietas de alto contenido en colesterol, valor basal de colesterol bajo, poco conocido, caro y difícil de mantener
<i>Primates</i> Primates no humanos	Especies muy próximas al ser humano y con respuestas dietéticas muy similares, aparición espontánea de la lesión	Variabilidad en la aparición de las lesiones; caros, difíciles de albergar y manejar, poca disponibilidad de animales, conflicto ético

CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad. Adaptada de Moghadasian et al¹⁰ y Moghadasian¹¹ con modificaciones.

nes polimórficas que afectan a los genes más directamente implicados en el desarrollo de la arteriosclerosis cuyas consecuencias anatomopatológicas no conocemos. Hechas estas consideraciones, que nos sitúan en un plano de humildad científica con respecto al conocimiento de la arteriosclerosis humana, se ha de reconocer que el punto cumbre de la arteriosclerosis, es decir, la rotura de la placa y la formación del trombo, lo presentan muy pocos modelos animales, e incluso los que lo sufren, se encuentran filogenéticamente alejados de la especie humana. Este panorama no es razón suficiente

para abandonar un enfoque tan repetidamente probado como parecen sugerir los autores de una reciente revisión⁴ al preguntarse: “Can animal models be regarded as a help? The answer is a qualified maybe”. Nuestra postura se basa en que cada modelo proporciona una información valiosa y que se requieren varios para concluir que esos resultados tengan relevancia para la especie humana. Si los resultados se confirman en distintos modelos que están separados filogenéticamente, la extrapolación será tanto más válida (tabla 1). Este criterio ha sido ampliamente usado a la hora de iniciar las fases clí-

nicas de nuevos fármacos y, a juzgar por nuestro arsenal terapéutico, no parece que haya funcionado mal.

En términos generales, la experimentación animal posee una serie de ventajas: en primer lugar, es posible elegir las especies y las subespecies más adecuadas para la experimentación, utilizando un número de animales suficientemente grande como para efectuar un análisis estadístico y completar los estudios en un corto período. Una segunda razón es la posibilidad de controlar las variables experimentales y valorar cada una de ellas de forma independiente del resto de los factores, seleccionando animales sanos o con anormalidades genéticas de características bien contrastadas en los que se pueden combinar factores de riesgo y enfermedades concurrentes. Por otro lado, el uso de animales es la única vía para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento, tanto preventivos como reparadores, antes de aplicarlos a la especie humana⁵. Por último, esta utilización de modelos animales permite trabajar en las condiciones ideales en cuanto a la posibilidad de elección de especie, tiempo y método de estudio, y facilita igualmente analizar el efecto de diferentes planteamientos experimentales en el animal, tanto vivo como muerto, así como la obtención de todo tipo de muestras⁶⁻⁸.

En la selección de animales para el estudio de la aterosclerosis, hay que tener en cuenta varios criterios, propuestos por Vesselinovitch⁹, cuya validez sigue vigente, aunque adaptada a los nuevos factores de riesgo^{10,11}. Estos criterios son:

1. Disponibilidad y coste de adquisición de los animales.
2. Facilidad de mantenimiento y manipulación.
3. Existencia de razas genéticamente puras.
4. Anatomía, fisiología y bioquímica similares a las de la especie humana.
5. Aparición de la enfermedad de forma espontánea o inducida por diversos agentes.
 - Desarrollo de lesiones con relativa facilidad.
 - Manipulación nutricional que favorezca el desarrollo de placas avanzadas.
 - Tiempo relativamente corto de desarrollo de lesiones graves.
7. Tamaño adecuado de las lesiones para facilitar la recogida y el análisis de las muestras.
8. Desarrollo del proceso similar al de la arteriosclerosis humana:
 - Lipoproteínas séricas y metabolismo de lípidos.
 - Patogenia de la lesión dependiente de hipercolesterolemia, hipertensión, hiperhomocisteinemia, inflamación, estrés oxidativo, etc.

- Topografía de la aparición de la lesión.
- Similitud de los componentes de la lesión.
- Desarrollo de complicaciones clínicas tales como calcificación, isquemia, infarto de miocardio, trombosis y gangrena, aneurismas, etc.

El propósito de esta revisión es resumir los conocimientos que existen sobre características del metabolismo lipoproteico y el desarrollo de la arteriosclerosis en algunos modelos animales presentes en la naturaleza.

Roedores

Cobaya

Cavia porcellus, además de requerir el aporte de vitamina C, presenta importantes rasgos del metabolismo lipoproteico que lo asemejan al de los humanos. Así, la mayoría de su colesterol plasmático se transporta en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), ya que posee la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP); no sintetiza apolipoproteína (Apo) B-48 en el hígado, debido a una disminuida capacidad para editar el ARNm de la Apo B; la biosíntesis y el catabolismo hepáticos del colesterol son moderados, y las hembras presentan valores más elevados de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) que los machos. En respuesta a la ovariectomía, las hembras manifiestan un perfil lipoproteico similar al de las mujeres menopáusicas y su respuesta a otro tipo de intervenciones es similar a la encontrada en sujetos de la especie humana. Con la administración de dietas hipercolesterolemiantes durante 3 meses, las cobayas desarrollan lesiones aórticas que disminuyen con la administración de ácido ascórbico. Las lesiones se caracterizan por la presencia de estría grasa y resultan más acusadas en los machos que en las hembras. Una detallada descripción de este modelo se encuentra en la revisión publicada por Fernández¹².

Conejo

Desde que Anitschkow¹³ hace 90 años demostrase la acumulación de colesterol en la aorta del conejo, esta especie ha sido ampliamente usada para el estudio de la arteriosclerosis, por el rápido desarrollo de las lesiones aórticas y el relativo bajo coste de su mantenimiento. Una excelente revisión del potencial de este modelo se puede encontrar en el trabajo de Brousseau y Hoeg¹⁴.

El conejo posee rasgos del metabolismo lipoproteico compartidos con el hombre. Así, el hígado no produce Apo B-48¹⁵, las lipoproteínas que contienen Apo B son similares en su composición a las

humanas y posee la CETP¹⁶. En cambio, se diferencia en la ausencia de la Apo A-II y en la baja actividad de la lipasa hepática¹⁷.

La mayoría de los estudios publicados analizan los efectos del colesterol en las dietas y, resumiendo, su aporte en éstas varía entre un 0,5 y un 4% del peso, con un período de administración de entre 8 y 16 semanas. Con estos protocolos experimentales se observa un elevado valor de colesterol plasmático (> 1.000 mg/dl) transportado en LDL y, principalmente, en β -lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (70 al 80% del total del colesterol), lipoproteínas secretadas por un hígado incapaz de eliminar el exceso de colesterol ingerido¹⁸⁻²². La elevada hipercolesterolemia se traduce en presencia de lesiones aórticas en el estadio de estría grasa. Así, con aportes de colesterol superiores al 1% del peso de la ingesta, se inducen fundamentalmente lesiones con abundantes células espumosas²³⁻²⁵ y en este fenómeno parece influir la edad del conejo utilizado, más pronunciado en individuos jóvenes²⁶. En cambio, con aportes de colesterol comprendidos entre el 0,125 y el 0,5% durante 6 u 8 meses se observa una progresión de la estría grasa a la lesión ateromatosa, tal como se evidencia por la presencia de mayor número de células musculares lisas, depósitos de colesterol y áreas necróticas en la aorta y los vasos epicárdicos²⁷⁻³³, un fenómeno que no ocurre en los vasos intramiocárdicos³⁴. Estos datos indican que en este modelo animal, la duración del ensayo y el aporte dietético de colesterol pueden modular el desarrollo de los estadios de la arteriosclerosis hacia un patrón más similar al humano en las lesiones aórticas, pero no en los vasos intramiocárdicos.

También la localización de las lesiones parece influida por el aporte de colesterol. Un aporte inferior al 0,15% induce su aparición en la aorta torácica superior, en tanto que aportes superiores a esta cifra producen una presencia generalizada de placas a lo largo de la íntima aórtica^{35,36}.

Existen razas de conejos, como la Watanabe (WHHL) y la St. Thomas' Hospital, que presentan alteraciones del metabolismo lipoproteico y que hacen más interesante este animal. La primera de ellas presenta un fenotipo de hipercolesterolemia familiar, ya que presenta un defecto en el gen del receptor LDL, y los animales homocigotos alcanzan cifras de colesterolemia de 400 a 800 mg/dl³⁷, mientras que la segunda manifiesta un fenotipo de hiperlipemia combinada familiar³⁸.

Entre los conejos Watanabe se han seleccionado, a su vez, estirpes con mayores valores de colesterol ligado a LDL (cLDL) y con desarrollo de placas ate-

romatosas en las coronarias³⁹. Con una estrategia de cruces selectivos, se ha obtenido incluso una variante de los anteriores que presenta infarto de miocardio⁴⁰. En estos animales, una estenosis de las coronarias por depósitos en el espacio subendotelial induce la aparición del infarto miocárdico por mecanismos independientes de la cantidad de colesterol, puesto que sus valores no son diferentes de los hallados en los Watanabe originales. Los infartos reproducen el patrón de presentación subendocárdico observado en los humanos, ya que varias arterias están afectadas. Para explicar el fenómeno, los autores describen un patrón de placa ateromatosa inestable con la presencia de una delgada capa fibrosa y acumulación de macrófagos en su superficie que podrían potenciar su rotura. Este modelo permite el estudio de infarto de miocardio a pesar de que no se ha observado la rotura de placas ni la trombosis intravascular que caracterizan el síndrome coronario humano.

Hámster

El hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) presenta rasgos comunes con los humanos, en cuanto a su metabolismo lipoproteico: el hígado únicamente produce Apo B-100⁴¹, la mayor parte del colesterol plasmático se transporta en LDL, las hembras presentan valores más elevados de cHDL⁴² y posee una capacidad hepática de metabolización del colesterol similar⁴³. Con la ingesta de una dieta enriquecida con grasa poliinsaturada se reduce su colesterol plasmático en HDL y se induce la expresión del receptor SR-BI⁴⁴⁻⁴⁶. A pesar de estas similitudes, es un animal con una baja actividad de la CETP, aproximadamente un 15% de la presente en humanos⁴⁷.

La administración de una dieta suplementada con grasa saturada y colesterol durante 4 semanas induce hipercolesterolemia y aterosclerosis, con presencia de estrías grasas en la aorta torácica, y se observa una menor susceptibilidad en las hembras que en los machos. El proceso se acentúa cuando se induce una diabetes experimental junto con la administración de la dieta grasa⁴⁸⁻⁵⁰. En este modelo se ha demostrado la regresión parcial de lesión en el estadio de estría grasa mediante el tratamiento con lovastatina o suministrando dietas de bajo contenido en colesterol y grasa⁵¹. Existen igualmente estirpes diferentes de este animal que no responden de la misma forma a la administración de dietas ricas en grasa y colesterol. Así, tras 12 semanas con esta alimentación, la variedad CR presentó valores más bajos de colesterol total en plasma, pero más depósito en la aorta que la estirpe

F, B⁵². Todos estos hallazgos experimentales están revalidando este modelo y actualmente se utiliza ampliamente para verificar la influencia de diversos agentes con potencial aplicación humana o para establecer los mecanismos de acción de otros agentes ya conocidos^{53,54}.

Rata

Las ratas son animales comunes de laboratorio que han servido como modelo en un gran número de estudios sobre lipoproteínas y arteriosclerosis. La rata tiene varias ventajas como animal de experimentación, que van desde la economía en su mantenimiento hasta una buena supervivencia tras complicados procesos quirúrgicos. Además, por su tamaño, requiere pequeñas cantidades tanto de alimento como de los agentes que se ensayan. Los estudios realizados en esta especie incluyen investigaciones sobre la cinética de las lipoproteínas (Lp) plasmáticas, la síntesis de colesterol, y las interacciones de las Lp y los tromboxanos o los péptidos endoteliales sobre el tono vascular.

La rata tiene, no obstante, algunas características distintas a los humanos que limitan su uso para ciertos estudios de la aterosclerosis y metabolismo lipoproteico. Está clasificada como un mamífero HDL, porque, a diferencia del hombre, en su plasma predominan estas lipoproteínas⁵⁵. Además, la CETP, que desempeña un papel importante en los perfiles lipoproteicos humanos, está ausente en la rata. También, carece de Apo (a) y, por tanto, de Lp(a) y de Apo D. Otra característica de este animal es que la metabolización del colesterol a ácidos biliares se ve incrementada por el aumento del consumo de colesterol en la dieta, mientras que en otras especies experimentales y en humanos este incremento compensatorio de la eliminación del colesterol no se produce. Precisamente, se considera que este proceso es el principal responsable de su resistencia para experimentar hipercolesterolemia, lo que indica que entre la rata y el hombre hay diferencias sustanciales en el metabolismo lipoproteico y en la regulación de las lipoproteínas plasmáticas⁵⁶.

La rata es muy resistente al desarrollo de aterosclerosis y, al igual que el ratón y el perro, presenta lesiones vasculares en la íntima y en la media sólo tras el consumo de una dieta rica en colesterol junto con la administración de tiouracilo y ácido cólico⁵⁷.

Entre las distintas razas de ratas existentes, la RICO manifiesta un fenotipo hipercolesterolémico, debido a un aumento de la síntesis de VLDL y quilomicrones, además de un descenso de su catabolismo⁵⁸. Por su parte, la rata obesa Zucker presenta una mutación del receptor de leptina que expresa

un fenotipo de dislipemia y de resistencia a la insulina, por lo que es un modelo animal del síndrome metabólico⁵⁹. Ambos modelos se han empleado para la inducción de hipercolesterolemia y el ensayo de agentes hipolipemiantes^{58,60}. Otras razas, como DOCA y SHR90-92, son modelos de hipertensión e igualmente se han utilizado para verificar la influencia de diversos agentes de ensayo⁶¹.

Ratón

El ratón es un animal ampliamente utilizado en investigación, ya que se reproduce con facilidad, tiene un tiempo de generación corto y se dispone de razas puras, muchas de las cuales poseen interesantes fenotipos heredables. Además, ocupa poco espacio y tiene un bajo coste de mantenimiento. Sin embargo, el ratón es un animal altamente resistente a la aterosclerosis⁶².

En su metabolismo lipoproteico se asemeja a la rata, ya que produce Apo B-48 en el hígado, al editar el ARNm de la Apo B¹⁵; además, carece de proteína transferidora de ésteres de colesterol⁶³, de Apo (a) y por tanto de Lp(a) y de Apo D, y es un animal HDL⁵⁵. Los estudios iniciales sobre las contribuciones genéticas a la enfermedad aterosclerótica se realizaron con ratones C57BL/6J, ya que sólo esta raza desarrolló procesos aterogénicos inducidos por una dieta enriquecida en grasa saturada y colesterol junto con ácido cólico^{64,65}. Con esta dieta, los ratones mostraban unos valores de colesterol 4 o 5 veces mayores que los presentes en los alimentados con una dieta estándar baja en lípidos, y la mayoría de este incremento se hallaba en las fracciones que no correspondían a las HDL. Por desgracia, este modelo no permite una representación exacta de la enfermedad humana, ya que es necesaria una dieta fuertemente enriquecida en colesterol en comparación con la humana y con un constituyente hepatotóxico, el ácido cólico. Esta valoración inicial de este modelo ha cambiado radicalmente por la posibilidad de llevar a cabo manipulaciones genéticas mediante tecnología transgénica y selección de genes. Dos excelentes revisiones en castellano de los modelos surgidos mediante este avance tecnológico se han publicado en esta Revista^{66,67}.

Aves

Paloma

Con su dieta cotidiana, este animal presenta un valor de colesterol plasmático elevado (300 mg/dl), que se transporta fundamentalmente en las HDL (hasta un 70%), y que aumenta hasta 2.000 mg/dl

cuando es alimentado con dietas enriquecidas con colesterol al 0,5% y sebo bovino al 10%. En este último caso, aumentan las lipoproteínas β -VLDL y LDL. Sin embargo, estos animales no poseen las Apo E ni B-48⁶⁸.

Existen razas como la Show Racer (SR) que son resistentes al desarrollo de aterosclerosis incluso con la administración de dietas de alto contenido en colesterol⁶⁹, y otras, como la White Carneau (WC), que la desarrollan espontáneamente con una dieta rica en grano. La susceptibilidad al desarrollo de la arteriosclerosis de este último animal parece atribuible tanto a defectos hereditarios en la capacidad de los macrófagos para exportar el colesterol⁷⁰⁻⁷², como en los transportadores intestinales, localizados fundamentalmente en la porción proximal del intestino delgado, e implicados en la eliminación fecal de esta molécula⁷³.

Las lesiones observadas en la paloma WC se localizan en las regiones torácica y abdominal de la aorta, en el tronco braquiocefálico y en las arterias ilíacas, carótidas, renales y coronarias; además, son muy similares tanto morfológica como ultraestructuralmente a las humanas. Así, se pueden presentar células espumosas, depósitos de colesterol y acumulación de matriz extracelular. En el caso de las placas avanzadas se observan focos calcificados y neovascularización, y estas placas pueden llegar a ulcerarse y formar trombos con el consiguiente desarrollo de infarto de miocardio^{69,74,75} en un cuadro muy semejante al humano. Todo indica que la paloma puede ser un buen modelo para el estudio de la arteriosclerosis.

Carnívoros

Perro

En este caso, también se trata de un animal con baja actividad de proteína transferidora de ésteres de colesterol, aproximadamente un 15% de la presente en humanos⁴⁷, y resistente al desarrollo de aterosclerosis e incluso a la dislipemia moderada cuando se alimenta con dietas suplementadas con colesterol y grasa. Es necesario hacerlos hipotiroideos para elevar su colesterolemia. Aun en estas circunstancias, y en presencia de hipercolesterolemia, no todos los animales desarrollan la enfermedad⁷⁶. En otros trabajos se ha demostrado que se requiere que las dietas enriquecidas en grasa y colesterol sean deficientes en ácidos grasos esenciales para inducir el proceso aterosclerótico. Así, empleando una dieta con un 5% en peso de colesterol y un 16% de aceite de coco hidrogenado, junto con falta de aporte de ácidos grasos esenciales, después

de un año de utilización se observa un aumento del 800% de la colesterolemia y el desarrollo de lesiones en la aorta abdominal, las ramas ilíacas y la arteria coronaria. Si en vez de aceite de coco se emplea el de cártamo, rico en ácido linoléico, no se consigue el efecto mencionado^{77,78}.

Cetartiodáctilos

Cerdo

Este animal posee una serie de rasgos interesantes comparables con los de la especie humana: es omnívoro, presenta hábitos sedentarios y propensión a la obesidad, y muchos de sus órganos son de un tamaño similar⁷⁹. A finales de los años ochenta, el cerdo empezó a ser considerado un buen modelo para el estudio del metabolismo lipoproteico y de la arteriosclerosis. En este sentido, el cerdo posee una distribución lipoproteínica similar a la encontrada en humanos, ya que transporta del 50 al 60% del colesterol en partículas LDL⁸⁰⁻⁸³, aunque presenta características propias que lo diferencian del hombre, como carecer de la CETP⁸⁴ y de la Apo A-II⁸⁵. Las características de su Apo A-IV, similar a la humana en un 75,6% y con una fuerte afinidad por las HDL, indican igualmente que este modelo animal se asemeja a la especie humana más que otras especies⁸⁶. Al igual que el hombre, cuando es alimentado con una dieta rica en grasa saturada (15-20%) y colesterol (1-2%), su colesterol plasmático se incrementa entre un 500 y un 800%, y a la vez desarrolla complejas lesiones arterioscleróticas^{6,80,82,87-95}. Asimismo, una inducción de diabetes experimental conlleva hipertrigliceridemia y una aceleración del proceso arteriosclerótico⁹⁶.

Los cerdos poseen un sistema cardiovascular muy similar al humano en el número de latidos y, por tanto, en el flujo sanguíneo⁹⁷, y su circulación coronaria, de igual modo, presenta muy pocas arterias colaterales⁹². Otro aspecto destacado es la reactividad farmacológica, análoga en ambas especies⁹⁸. Los cambios experimentados en la circulación coronaria en estos modelos de coronariopatías se asemejan a los descritos en pacientes humanos^{97,99}. Incluso la variedad de cerdo blanco Belga presenta muerte súbita cuando es sometido a estrés¹⁰⁰.

Existen variedades naturales de cerdos con fenotipos interesantes para el campo de la arteriosclerosis: uno de ellos es el que presenta como característica principal una Apo B-100 alterada, que provoca la enfermedad denominada disbetalipoproteinemia familiar (FDB)¹⁰¹. En humanos, esta deficiencia parece deberse únicamente al cambio

de un aminoácido de la Apo B-100^{102,103}. Esta mutación provoca una unión deficiente entre las LDL y su receptor, deficiencia similar a la que presentan los pacientes que sufren hipercolesterolemia familiar, cuyo defecto se encuentra en el receptor de LDL. En ambos casos, el catabolismo mediado por el receptor se ve disminuido y produce hipercolesterolemia debida al aumento de LDL.

Actualmente, el modelo animal que más se asemeja a la disbetalipoproteinemia familiar humana es una raza de cerdos con hipercolesterolemia inherente a las LDL (IHLC). Las LDL de estos cerdos son más grandes y menos pesadas que las de los controles, ya que están enriquecidas en ésteres de colesterol y, a su vez, presentan un menor catabolismo cuando se inyectan a cerdos controles¹⁰⁴. Por otra parte, la lesión desarrollada de forma espontánea por este animal, al año de edad, presenta focos principales en arterias coronarias, ilíacas y femorales. A los 2 años, aparecen lesiones estenóticas complicadas con capas fibrosas, núcleos necróticos, acumulación de colesterol, depósitos de calcio y neovascularizaciones en las principales arterias coronarias. A los 3 años, se hallan lesiones complejas con nueva vascularización en la íntima de las arterias, hemorragias y rotura de la placa¹⁰⁵. Sin embargo, parece que la IHLC no es un modelo perfecto para estudiar la disbetalipoproteinemia familiar humana, ya que al secuenciar el ADN de la región de unión de la Apo B-100 del cerdo no se detectó ninguna mutación exclusiva de este alelo, y estos cerdos tienen una actividad normal del receptor de LDL.

En resumen, el cerdo es un buen modelo para el estudio de los efectos del colesterol de la dieta y otros lípidos sobre la biología de las arterias coronarias, el estudio de las complicaciones isquémicas coronarias y su diagnóstico, y los mecanismos involucrados en la restenosis tras la angioplastia, junto con los agentes que pueden interferir con la restenosis o prevenirla¹⁰⁰. Asimismo, debido a las similitudes anatómicas y fisiológicas y en su reactividad farmacológica, el cerdo es un animal especialmente recomendado para el desarrollo de nuevos procedimientos terapéuticos y quirúrgicos^{94,106}. En su contra, hay que mencionar que el coste de su mantenimiento y estabulación resultan prohibitivos para muchos laboratorios.

Primates

Primates no humanos

Los primates no humanos presentan una gran proximidad filogenética con la especie humana, lo

que se refleja, a título de ejemplo, en que las Apo A-IV y C-III del macaco y del hombre son semejantes en un 87% de sus aminoácidos, y para la Apo A-II la semejanza alcanza hasta el 94%^{107,108}. Debido a esta alta similitud genética entre ambas especies, presentan una considerable similitud fisiológica y comparten, por tanto, la susceptibilidad a las mismas enfermedades. Si bien el grupo de los primates no humanos es muy diverso, desde el punto de vista del metabolismo lipoproteico podemos diferenciar 2 grandes grupos: los que transportan el colesterol plasmático mayoritariamente en las HDL (género *Cebus*)¹⁰⁹ y los que lo hacen en las LDL (género *Macaca*)¹¹⁰. Esta diferencia asociada a la actividad de la CETP¹¹¹ no se corresponde exactamente con los subórdenes taxonómicos de platirrinos y catarrinos, y podría contribuir a explicar las respuestas a las diferentes dietas. En este sentido, en el mono verde africano y en el *Cebus* de cara blanca se ha demostrado que el tipo de grasa de la dieta regula la expresión de la Apo A-I, principal constituyente de las HDL, al aumentar la expresión de su ARNm con el aporte de grasa saturada y disminuir con la ingesta de grasa poliinsaturada^{112,113}. Sin embargo, el macaco desarrolla más hipercolesterolemia y menor inducción de la expresión del gen de la Apo A-I que el mono verde africano en respuesta a una dieta rica en grasa saturada y colesterol¹¹⁴. Igualmente, el macaco con dietas de alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados presenta un descenso de las HDL, debido fundamentalmente a un elevado catabolismo de estas partículas¹¹⁵. Esta especie es extraordinariamente sensible a la ingesta de colesterol dietético comparado con la humana, y sus concentraciones de colesterol plasmático se llegan a elevar hasta 20 veces en algunos estudios¹¹⁶.

Con dietas de alto contenido en colesterol, primates como los chimpancés, los monos araña, el aullador, el *Rhesus*, los babuinos y los macacos desarrollan una forma de arteriosclerosis muy similar a la humana¹¹⁷⁻¹¹⁹. Según el grado y la gravedad de las lesiones arterioscleróticas, los monos se clasifican en hipo e hiperrespondedores¹¹⁹⁻¹²²; por otra parte, la localización de estas lesiones es muy variable, según la especie estudiada. Así, los machos *Rhesus*¹²³ desarrollan las lesiones en la bifurcación de la rama descendente anterior y ramas circunflejas de las arterias coronarias, en tanto que en los cébidos aquéllas aparecen en la bifurcación carotídea y en la coronaria¹²⁰. El macaco únicamente desarrolla lesiones en la coronaria y no en la aorta¹²⁴, mientras que la situación contraria se observa en el mono verde africano, con preferencia hacia la aor-

ta abdominal¹²⁰. Todavía más, aun en una misma especie existe mucha variabilidad por la concurrencia de otros factores; en este sentido, macacos con deficiencia del receptor de LDL presentan lesiones en la aorta y en menor extensión en las coronarias¹²⁵, y en el caso del mono verde africano, otros autores describen un patrón más difuso de presentación que el referido anteriormente¹²⁶.

De todos los primates no humanos, el macaco es el modelo que mejor representa la progresión de la arteriosclerosis humana en respuesta a la dieta y la posibilidad de su regresión y, por ende, el más empleado¹²⁷⁻¹³⁰. Sus lesiones inflamatorias y concéntricas son particularmente resistentes a la regresión¹³¹. Así, un suplemento de vitaminas (ácido fólico, vitamina B₁₂ y vitamina B₆) capaz de prevenir la hiperhomocisteinemia tuvo poco efecto sobre la vasodilatación dependiente del endotelio y el engrosamiento de la íntima de las arterias carótidas o ilíacas¹³². Este último está asociado a la presencia de radicales O₂⁻ y valores elevados de NAD(P)H oxidasa, que disminuyen a medida que mejora la función endotelial¹³³. En la regresión dietética también se observa un aumento de la actividad anticoagulante en respuesta a la trombina en estos animales¹³⁴.

Los macacos también presentan una respuesta a la angioplastia muy similar a la humana en cuanto a la extensión de la pared arterial afectada, la rotura de la placa, la rotura de la media o deslaminación, y la formación de pequeños trombos en la superficie luminal dañada. En etapas posteriores, se produce igualmente una disminución del calibre de la luz por contracción del vaso e hiperplasia de la neoíntima. En algunos casos en los que se observa un aumento del calibre vascular, éste se debe a un aumento del diámetro del vaso por un proceso de remodelado¹³⁵.

Para el estudio de la regresión también se han empleado otros primates. En este sentido, *Rhesus* sometidos a un consumo de dietas hipercolesterolémicas ricas en grasa saturada y colesterol durante 5 años desarrollan un cuadro de lesiones excéntricas en la íntima de la aorta y las carótidas que experimenta regresión cuando posteriormente se les alimenta con dietas desprovistas de dichos componentes durante, al menos, 1,5 años. En cambio, la regresión de la lesión coronaria requiere de un período más prolongado^{130,136}.

En resumen, la respuesta dietética similar a la humana hace que los primates no humanos sean unos excelentes modelos para el estudio de la arteriosclerosis. En cambio, la variabilidad en el desarrollo de la lesión, el elevado coste y la limitada disponibilidad de animales, unida al hecho de que

alguno de ellos sea especie protegida, los riesgos de su manejo y la existencia de problemas éticos limitan su uso en el estudio de la arteriosclerosis¹³⁷.

Conclusión

A tenor de la exposición precedente, es evidente que se dispone de unas herramientas de trabajo poderosísimas, con un siglo de experiencia, que permiten tanto el estudio de la implicación de diferentes componentes ambientales en la patogenia de la arteriosclerosis, como el desarrollo de procedimientos más seguros y efectivos, y menos invasivos de tratamiento. Bien es verdad que cuanto mayor es el conocimiento que se posee de los distintos modelos animales, más evidente parece que no existe uno ideal que responda satisfactoriamente a todos los problemas planteados. Siempre habrá diferencias con la enfermedad humana, por lo que al elegir el modelo animal hay que tener en cuenta el aspecto concreto que se va a estudiar^{7,8,10}. Por ello, como no existe un modelo ideal, se han de utilizar varios antes de extrapolar los resultados de cualquier potencial tratamiento que estabilice la placa o que induzca su regresión, y su aplicación al paciente humano ha de confirmarse en voluntarios humanos⁴. A pesar de estas limitaciones, las ventajas para seleccionar nuevos procedimientos diagnósticos y tratamientos, así como para generar nuevos conocimientos sobre componentes de las placas que, a su vez, generen nuevos diagnósticos y terapias, hacen que la utilización de modelos animales sea imprescindible en la investigación en el campo de la patología cardiovascular. El conocimiento de los modelos espontáneos de la naturaleza no se ha agotado y, de hecho, puede proporcionar excelentes resultados cuando se complementa con la transgenia. La aplicación de la modificación genética en el conejo y en la rata es una realidad que está reforzando el conocimiento en el campo cardiovascular obtenido en el ratón por medio de esta tecnología¹⁴. A esta tendencia se pueden añadir manipulaciones transgénicas en el cerdo y los primates que, aunque más costosas, son igualmente viables.

Perspectivas de futuro

El mejor conocimiento de las particularidades de los diferentes animales, unido al previsible conocimiento del genoma de muchas de las especies mencionadas, nos llevará en un corto período al análisis genómico comparado, que permitirá predecir el alcance fisiopatológico de muchas variaciones génicas. Un enfoque de este tipo ya está

produciendo resultados en este momento, por comparación de los genomas de ratón y humano¹³⁸. A su vez, las estrategias genómicas, mediante el desarrollo de chips, permitirán conocer las respuestas tisulares específicas a las más variadas situaciones ambientales^{3,139}. La información obtenida con ambos enfoques supondrá un avalancha de conocimientos de tal magnitud que su encauzamiento para establecer las categorías o patrones de expresión exigirá nuevos desarrollos informáticos para que su manejo sea ágil y, sobre todo, para que sean más asequibles a los profesionales. De esta forma, se podrán proporcionar respuestas a interrogantes fundamentales, como la susceptibilidad individual al desarrollo de la arteriosclerosis y su localización en el árbol arterial en un determinado entorno genético-ambiental y la regresión de las lesiones establecidas.

Bibliografía

- Ross R. Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
- Ignatowski AC. Influence of animal food on the organism of rabbits. *Izv Imp Voenno-Med Akad Peter.* 1908;16:154-73.
- VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1-11.
- Cullen P, Baetta R, Bellosa S, Bernini F, Chinetti G, Cignarella A, et al. Rupture of the atherosclerotic plaque. Does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:535-42.
- Helft G, Worthley SG, Fuster V, Fayad ZA, Zaman AG, Corti R, et al. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Monitoring with serial noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2002;105:993.
- Jokinen MP, Clarkson TB, Prichard RW. Animal models in atherosclerosis research. *Exp Mol Pathol.* 1985;42:1-28.
- Vesselinovitch D. Animal models of atherosclerosis, their contributions and pitfalls. *Artery.* 1979;5:193-206.
- Vesselinovitch D, Wissler R. Prevention and regression in animal models by diet and cholestyramine. International symposium: state of prevention and therapy in human arteriosclerosis and in animal models. 1979;26:127-34.
- Vesselinovitch D. Animal models and the study of atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112:1011-7.
- Moghadasian MH, Frohlich JJ, McManus BM. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab Invest.* 2001;81:1173-83.
- Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 2002;70:855-65.
- Fernández ML. Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr.* 2001;131:10-20.
- Anitschkow N. Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur Allgemeinen Pathologie. 1913;56:379-404.
- Brousseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res.* 1999;40:365-75.
- Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1993;34:1367-83.
- Nagashima M, McLean JW, Lawn RM. Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1988;29:1643-9.
- Warren RJ, Ebert DL, Mitchell A, Barter PJ. Rabbit hepatic lipase cDNA sequence: low activity is associated with low messenger RNA levels. *J Lipid Res.* 1991;32:1333-9.
- Thompson KH, Zilversmit DB. Plasma very low density lipoprotein (VLDL) in cholesterol-fed rabbits: chylomicron remnants or liver lipoproteins? *J Nutr.* 1983;113:2002-10.
- Mackinnon AM, Savage J, Gibson RA, Barter PJ. Secretion of cholesteryl ester-enriched very low density lipoproteins by the liver of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1985;54:145-55.
- Kroon PA, Thompson GM, Chao Y. β -very low density lipoproteins in cholesterol-fed rabbits are of hepatic origin. *Atherosclerosis.* 1985;56:323-9.
- Brattsand R. Distribution of cholesterol and triglycerides among lipoprotein fractions in fat-fed rabbits at different levels of serum cholesterol. *Atherosclerosis.* 1976;23:97-110.
- Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits, I: focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis.* 1989;9:895-907.
- Ross AC, Minick CR, Zilversmit DB. Equal atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free, low-fat diet or cholesterol-supplemented diet. *Atherosclerosis.* 1978;29:301-15.
- Orlandi A, Mauriello A, De Angelis C, Ramacci MT, Spagnoli LG. Age-related differences in the distribution and occurrence of atherosclerotic aortic lesions in the hyperlipemic rabbit. *Arch Gerontol Geriatr.* 1992;16:295-302.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Vesselinovitch D, Wissler RW. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis, II: peanut oil. *Atherosclerosis.* 1971;14:53-64.
- Cortés MJ, Díez-Juan A, Pérez P, Pérez-Roger I, Arroyo-Pellicer R, Andrés V. Increased early atherogenesis in young *versus* old hypercholesterolemic rabbits by a mechanism independent of arterial cell proliferation. *FEBS Letters.* 2002;522:99-103.
- Adams CW, Miller NE, Morgan RS, Rao SN. Lipoprotein levels and tissue lipids in fatty-fibrous atherosclerosis induced in rabbits by two years' cholesterol feeding at a low level. *Atherosclerosis.* 1982;44:1-8.
- Walker LN, Reidy MA, Bowyer DE. Morphology and cell kinetics of fatty streak lesion formation in the hypercholesterolemic rabbit. *Am J Pathol.* 1986;125:450-9.
- Spagnoli LG, Orlandi A, Mauriello A, Santeusano G, De Angelis C, Lucreziotti R, et al. Aging and atherosclerosis in the rabbit, I: distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1991;89:11-24.
- Bocan TM, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis.* 1993;102:9-22.
- Bocan TM, Mueller SB, Uhlendorf PD, Ferguson E, Newton RS. Dietary and mechanically induced rabbit iliac-femoral atherosclerotic lesions: a chemical and morphologic evaluation. *Exp Mol Pathol.* 1991;54:201-17.
- Lupu F, Danaricu I, Simionescu N. Development of intracellular lipid deposits in the lipid-laden cells of atherosclerotic lesions: a cytochemical and ultrastructural study. *Atherosclerosis.* 1987;67:127-42.
- Daley SJ, Klemp KF, Guyton JR, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis, II: differing morphological severity of atherogenesis despite matched plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:105-14.
- Kolodgie FD, Katocs AS, Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, et al. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol: methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1454-64.
- Daley SJ, Herderick EE, Cornhill JF, Rogers KA. Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis, I: differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14:95-104.
- Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H, Shen L, Mehta P, et al. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1433-9.
- Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis.* 1980;36:261-8.

38. Beatty TH, Prenger VL, Virgil DG, Lewis B, Kwiterovich PO, Bachorik PS. A genetic model for control of hypertriglyceridemia and apolipoprotein B levels in the Johns Hopkins colony of St. Thomas Hospital rabbits. *Genetics*. 1992;132:1095-104.
39. Shiomi M, Ito T, Shiraishi M, Watanabe Y. Inheritability of atherosclerosis and the role of lipoproteins as risk factors in the development of atherosclerosis in WHHL rabbits: risk factors related to coronary atherosclerosis are different from those related to aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1992; 96: 43-52.
40. Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Development of an Animal Model for Spontaneous Myocardial Infarction (WHHLMI Rabbit). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23: 1239-44.
41. Arbeeny CM, Meyers DS, Bergquist KE, Gregg RE. Inhibition of fatty acid synthesis decreases very low density lipoprotein secretion in the hamster. *J Lipid Res*. 1992;33:843-51.
42. Wilson TA, Nicolosi RJ, Lawton CW, Babiak J. Gender differences in response to a hypercholesterolemic diet in hamsters: effects on plasma lipoprotein cholesterol concentrations and early aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;146:83-91.
43. Spady DK, Woollett LA, Dietschy JM. Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. *Ann Rev Nutr*. 1993;13:355-81.
44. Ahn YS, Smith D, Osada J, Li Z, Schaefer EJ, Ordovas JM. Dietary fat saturation affects apolipoprotein gene expression and high density lipoprotein size distribution in golden Syrian hamsters. *J Nutr*. 1994;124:2147-55.
45. Van Tol A, Terpstra AHM, Van den Berg P, Beynen AC. Dietary corn oil *versus* olive oil enhances HDL protein turnover and lowers HDL cholesterol levels in hamsters. *Atherosclerosis*. 1999; 147:87-94.
46. Spady DK, Kearney DM, Hobbs HH. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-B1) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J Lipid Res*. 1999;40:1384-94.
47. Goulinet S, Chapman MJ. Plasma lipoproteins in the Golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*): heterogeneity of apoB- and apoA-I-containing particles. *J Lipid Res*. 1993;34:943-59.
48. Nistor A, Bulla A, Filip DA, Radu A. The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1987;68:159-73.
49. Sullivan MP, Cerda JJ, Robbins FL, Burgin CW, Beatty RJ. The gerbil, hamster, and guinea pig as rodent models for hyperlipidemia. *Lab Anim Sci*. 1993;43:575-8.
50. El-Sweify S, Schaefer EJ, Seman LJ, Van Dongen D, Sevanian A, Smith DE, et al. The effect of vitamin E, probucol, and lovastatin on oxidative status and aortic fatty lesions in hyperlipidemic-diabetic hamsters. *Atherosclerosis*. 2000;149:277-86.
51. Pitman WA, Osgood DP, Smith D, Schaefer EJ, Ordovas JM. The effects of diet and lovastatin on regression of fatty streak lesions and on hepatic and intestinal mRNA levels for the LDL receptor and HMG CoA reductase in F1B hamsters. *Atherosclerosis*. 1998; 138:43-52.
52. Dorfman SE, Smith DE, Osgood DP, Lichtenstein AH. Study of diet-induced changes in lipoprotein metabolism in two strains of golden-Syrian hamsters. *J Nutr*. 2003;133:4183-8.
53. Terpstra AHM, Lapre JA, De Vries HT, Beynen AC. The hypocholesterolemic effect of lemon peels, lemon pectin, and the waste stream material of lemon peels in hybrid F1B hamsters. *Eur J Nutr*. 2002;41:19-26.
54. Wilson TA, Foxall TL, Nicolosi RJ. Doxazosin, an alpha-1 antagonist, prevents further progression of the advanced atherosclerotic lesion in hypercholesterolemic hamsters. *Metabolism*. 2003;52: 1240-5.
55. Chapman MJ. Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology*. 1986;128:70-143.
56. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res*. 1993; 34:1637-59.
57. Hadjiisky P, Bourdillon M, Grosogeat Y. Modèles expérimentaux d'athérosclérose. Apports, limites et perspectives. *Arch Mal Coer*. 1991;84:1593-603.
58. Ouguerram K, Magot T, Lutton C. Alterations in cholesterol metabolism in the genetically hypercholesterolemic RICO rat: an overview. En: Malmendier CL, Alaupovic P, Brewer HB, Jr, editors. *Hypercholesterolemia, hypocholesterolemia, hypertriglyceridemia, in vivo kinetics*. New York: Plenum Press; 1991. p. 257-74.
59. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension*. 1992;19:110-5.
60. Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, Karppanen H. Supplementation of plant sterols and minerals benefits obese Zucker rats fed an atherogenic diet. *J Nutr*. 2002;132:231-7.
61. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: animal and human studies. *Circulation*. 2003; 108:2034-40.
62. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57:65-73.
63. Tall A. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1993;34:1255-74.
64. Nishina P, Verstyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res*. 1990; 31:859-69.
65. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57:65-73.
66. Casacuberta AM, Escola-Gil JC, Julve-Gil J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. Modificación genética de animales de laboratorio (II): metabolismo lipoproteico y arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl*. 1998;10:78-87.
67. Casacuberta AM, Escola-Gil JC, Julve-Gil J, González-Sastre F, Blanco-Vaca F. Modificación genética de animales de laboratorio (I): metabolismo lipoproteico y arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl*. 1998;10:19-31.
68. Barakat HA, St Clair RW. Characterization of plasma lipoproteins of grain and cholesterol-fed White Carneau and Show Racer pigeons. *J Lipid Res*. 1985;26:1252-68.
69. Jerome WG, Lewis JC. Early atherogenesis in White Carneau pigeons: II: ultrastructural and cytochemical observations. *Am J Pathol*. 1985;119:210-22.
70. Yancey PG, St. Clair RW. Mechanism of the defect in cholesterol ester clearance from macrophages of atherosclerosis-susceptible white carneau pigeons. *J Lipid Res*. 1994;35:2114-29.
71. Yancey PG, St. Clair RW. Cholesterol efflux is defective in macrophages from atherosclerosis-susceptible White Carneau pigeons relative to resistant show racer pigeons. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1291-304.
72. Smith SC, Smith EC, Taylor RLJ. Susceptibility to spontaneous atherosclerosis in pigeons: an autosomal recessive trait. *J Hered*. 2001;92:439-42.
73. Subbiah MT, Connelly PW. Effect of dietary restriction on plasma cholesterol and cholesterol excretion in the White Carneau pigeon. *Atherosclerosis*. 1976;24:509-13.
74. Santerre RF, Wight TN, Smith SC, Brannigan D. Spontaneous atherosclerosis in pigeons: a model system for studying metabolic parameters associated with atherogenesis. *Am J Pathol*. 1972;67: 1-22.
75. Jerome WG, Lewis JC. Cellular dynamics in early atherosclerotic lesion progression in white carneau pigeons-spatial and temporal analysis of monocyte and smooth muscle invasion of the intima. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;15:654-64.
76. Mahley RW, Innerarity T. Canine lipoproteins and atherosclerosis: II. Characterization of plasma lipoproteins associated with atherogenic and non-atherogenic hyperlipidemia. *Circ Res*. 1974; 35:722-33.
77. Butkus A, Ehrhart LA, McCullagh KG. Plasma and aortic lipids in experimental canine atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*. 1976;25: 152-62.
78. McCullagh KG, Ehrhart LA, Butkus A. Experimental canine atherosclerosis and its prevention. *Lab Invest*. 1976;34:394-405.
79. Dixon JL, Stoops JD, Parker JL, Laughlin MH, Weisman GA, Sturek M. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19: 2981.

80. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity T, Brewer HBJ, Assmann G. Swine lipoproteins and atherosclerosis: changes in the plasma lipoproteins and apolipoproteins induced by cholesterol feeding. *Biochemistry*. 1975;14:2817-23.
81. Thomas WA, Lee KT, Kim DN. Pathogenesis of atherosclerosis in the abdominal aorta and coronary arteries of swine in the first 90 days on a hyperlipidemic diet. En: Tumbleson ME, editor. *Swine in biomedical research*. New York: Plenum Press; 1986. p. 1511-25.
82. Kim DN, Ho HT, Lawrence DA, Schmee J, Thomas WA. Modification of lipoprotein patterns and retardation of atherogenesis by a fish oil supplement to a hyperlipidemic diet for swine. *Atherosclerosis*. 1987;76:35-43.
83. Chapman MJ, Goldstein S. Comparison of the serum low density lipoprotein and of its apoprotein in the pig, *rhesus* monkey and baboon with that in man. *Atherosclerosis*. 1976;25:267-91.
84. GuyardDangremont V, Desrumaux C, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comp Biochem Physiol*. 1998;120:517-25.
85. Pussinen PJ, Jauhainen M, Ehnholm C. ApoA-II/apoA-I molar ratio in the HDL particle influences phospholipid transfer protein-mediated HDL interconversion. *J Lipid Res*. 1997;38:12-21.
86. Navarro MA, Acín S, Iturralde M, Calleja L, Carnicer R, Guzmán-García MA, et al. Cloning, characterization and comparative analysis of pig plasma apolipoprotein A-IV. *Gene*. 2004;5:157-64.
87. Royo T, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L. Effect of gemfibrozil on peripheral atherosclerosis and platelet activation in a pig model of hyperlipidemia. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:843-52.
88. Palazon CP, Alfon J, Gaffney P, Berrozpe M, Royo T, Badimon L. Effects of reducing LDL and increasing HDL with gemfibrozil in experimental coronary lesion development and thrombotic risk. *Atherosclerosis*. 1998;136:333-45.
89. Fuster V, Lie JT, Badimon L, Rosemark JA, Badimon JJ, Bowie EJ. Spontaneous and diet-induced coronary atherosclerosis in normal swine and swine with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis*. 1985;5:67-73.
90. Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr., Dewanjee MK, Badimon L, et al. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res*. 1985;57:105-12.
91. Badimon L, Steele P, Badimon JJ, Bowie EJ, Fuster V. Aortic atherosclerosis in pigs with heterozygous von Willebrand disease. Comparison with homozygous von Willebrand and normal pigs. *Arteriosclerosis*. 1985;5:366-70.
92. Lee KT. Swine as animal models in cardiovascular research. En: Tumbleson ME, editor. *Swine in biomedical research*. New York: Plenum Press; 1986. p. 1481-96.
93. Bell FP, Gerrity RG. Evidence for an altered lipid metabolic state in circulating blood monocytes under conditions of hyperlipemia in swine and its implications in arterial lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1992;12:155-62.
94. Reitman JS, Mahley RW, Fry DL. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1982;43:119-32.
95. Phillips RW, Panepinto LM, Spangler R, Westmoreland N. Yucatan miniature swine as a model for the study of human diabetes-mellitus. *Diabetes*. 1982;31:30-6.
96. Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-Induced Accelerated Atherosclerosis in Swine. *Diabetes*. 2001;50:1654-65.
97. White FC, Bloor CM. The pig as a model for myocardial ischemia. En: Tumbleson ME, editor. *Swine in biomedical research*. New York: Plenum Press; 1986. p. 481-90.
98. Feletou M, Teisseire B. Vascular pharmacology of the micropig: importance of the endothelium. En: Swindle MM, Phillips LD, editor. *Swine as models in biomedical research*. Ames: Iowa State University Press; 1992. p. 74-95.
99. Schaper W, Schaper J. *Collateral Circulation*. New York: Kluwer Academic Publishers; 1993.
100. Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost*. 2001;86:356-65.
101. Rapacz J, Hasler-Rapacz J, Taylor KM, Checovich WJ, Attie AD. Lipoprotein mutations in pigs are associated with elevated plasma cholesterol and atherosclerosis. *Science*. 1986;234:1573-7.
102. Innerarity TL. Low density lipoprotein receptor-ligand interactions. *Atheroscler Rev*. 1990;20:90-101.
103. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 1990;31:1337-49.
104. Checovich WJ, Fitch WL, Krauss RM, Smith MP, Rapacz J, Smith CI, et al. Defective catabolism and abnormal composition of low density lipoprotein from mutant pigs with hypercholesterolemia. *Biochemistry*. 1988;27:1934-41.
105. Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Linder JV, Rapacz J. Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterol bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol*. 1991;139:139-47.
106. Ratcliffe H, Uginbuhl H. The domestic pig: a model for experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1971;13:133-6.
107. Osada J, Pocovi M, Nicolosi RJ, Schaefer EJ, Ordovas JM. Nucleotide sequences of the Macaca fascicularis apolipoprotein C-III and A-IV genes. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1172:335-9.
108. Osada J, Garcés C, Sastre J, Schaefer EJ, Ordovas JM. Molecular cloning and sequence of the cynomolgus monkey apolipoprotein A-II gene. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1172:340-2.
109. Hennessy LK, Osada J, Ordovas JM, Nicolosi RJ, Stucchi AF, Brousseau ME, et al. Effects of dietary fats and cholesterol on liver lipid content and hepatic apolipoprotein A-I, B, and E and LDL receptor mRNA levels in cebus monkeys. *J Lipid Res*. 1992;33:351-60.
110. Brousseau ME, Ordovas JM, Osada J, Fasulo J, Robins SJ, Nicolosi RJ, et al. Dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are comparable in their effects on hepatic apolipoprotein mRNA abundance and liver lipid concentrations when substituted for saturated fatty acids in cynomolgus monkeys. *J Nutr*. 1995;125:425-36.
111. Fusegawaa Y, Kelleys KL, Sawyera JK, Shaha RN, Rudel LL. Influence of dietary fatty acid composition on the relationship between CETP activity and plasma lipoproteins in monkeys. *J Lipid Res*. 2001;42:1849-57.
112. Sorci-Thomas M, Prack MM, Dashti N, Johnson F, Rudel LL, Williams DL. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1989;30:1397-403.
113. Stucchi AF, Hennessey LK, Vespa DB, Weiner EJ, Osada J, Ordovas JM, et al. Effect of corn and coconut oil-containing diets with and without cholesterol on high-density lipoprotein apolipoprotein A-I metabolism and hepatic apolipoprotein A-I mRNA levels in Cebus Monkeys. *Arteriosclerosis*. 1991;11:1719.
114. Sorci-Thomas M, Prack MM, Dashti N, Johnson F, Rudel LL, Williams DL. Apolipoprotein (apo) A-I production and mRNA abundance explain plasma apoA-I and high density lipoprotein differences between two non-human primate species with high and low susceptibilities to diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem*. 1988;263:5183-9.
115. Brousseau ME, Schaefer EJ, Stucchi AF, Osada J, Vespa DB, Ordovas JM, et al. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance apolipoprotein A-I catabolism but do not affect either its production or hepatic mRNA abundance in cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis*. 1995;115:107-19.
116. Gupta SV, Khosla P. Palmitic and stearic acids similarly affect plasma lipoprotein metabolism in cynomolgus monkeys fed diets with adequate levels of linoleic acid. *J Nutr*. 2001;131:2115-20.
117. Malinow MR, Maruffo CA. Naturally occurring atherosclerosis in howler monkeys (*Alouatta caraya*). *J Atheroscler Res*. 1966;6:368-80.
118. Stary HC, Malinow MR. Ultrastructure of experimental coronary artery atherosclerosis in cynomolgus macaques: a comparison with the lesions of other primates. *Atherosclerosis*. 1982;43:151-75.
119. Carey KD. Non-human primate models of atherosclerosis. En: Strong WB, editor. *Atherosclerosis: its pediatric aspects*. Orlando: Grune and Stratton; 1978. p. 41-83.
120. Bullock BC, Lehner ND, Clarkson TB, Feldner MA, Wagner WD, Lofland HB. Comparative primate atherosclerosis. I. Tissue cholesterol concentration and pathologic anatomy. *Exp Mol Pathol*. 1975;22:151-75.

121. Clarkson TB, Lofland HB Jr., Bullock BC, Goodman HO. Genetic control of plasma cholesterol. Studies on squirrel monkeys. *Arch Pathol.* 1971;92:37-45.
122. Pronczuk A, Patton GM, Stephan ZF, Hayes KC. Species variation in the atherogenic profile of monkeys: relationship between dietary fats, lipoproteins, and platelet aggregation. *Lipids.* 1991;26:213-22.
123. Stary HC. Coronary artery fine structure in rhesus monkeys: the early atherosclerotic lesion and its progression. *Primates Med.* 1976;9:359-95.
124. Kramsch DM, Hollander W. Occlusive atherosclerotic disease of the coronary arteries in monkey (*Macaca irus*) induced by diet. *Exp Mol Pathol.* 1968;9:1-22.
125. Kusumi Y, Scanu AM, McGill HC, Wissler RW. Atherosclerosis in a rhesus monkey with genetic hypercholesterolemia and elevated plasma Lp(a). *Atherosclerosis.* 1993;99:165-74.
126. Fincham JE, Benade AJ, Kruger M, Smuts CM, Gobregts E, Chilton DO, et al. Atherosclerosis: aortic lipid changes induced by diets suggest diffuse disease with focal severity in primates that model human atheromas. *Nutrition.* 1998;14:17-22.
127. Beere PA, Glagov S, Zarins CK. Experimental atherosclerosis at the carotid bifurcation of the cynomolgus monkey: localization, compensatory enlargement, and the sparing effect of lowered heart rate. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:1245-53.
128. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Potvin-Klein K. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *JAMA.* 1994;271:289-94.
129. 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;94:155-64.
130. Strong JP, Bhattacharyya AK, Eggen DA, Stary HC, Malcom GT, Newman WP, et al. Long-term induction and regression of diet-induced atherosclerotic lesions in rhesus monkeys, II: morphometric evaluation of lesions by light microscopy in coronary and carotid arteries. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:2007-16.
131. Wissler RW, Vesselinovitch D. Can atherosclerotic plaques regress? Anatomic and biochemical evidence from nonhuman animal models. *Am J Cardiol.* 1990;65:F33-40.
132. Lentz SR, Piegors DJ, Malinow MR, Heistad DD. Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. *Circulation.* 2001;103:1006.
133. Hathaway CA, Heistad DD, Piegors DJ, Miller FJ. Regression of atherosclerosis in monkeys reduces vascular superoxide levels. *Circ Res.* 2002;90:277.
134. Lentz SR, Miller JFJ, Piegors DJ, Erger RA, Fernández JA, Griffin JH, et al. Anticoagulant responses to thrombin are enhanced during regression of atherosclerosis in monkeys. *Circulation.* 2002;106:842.
135. Geary RL, Williams JK, Golden D, Brown DG, Benjamin ME, Adams MR. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:34-43.
136. Strong JP, Bhattacharyya AK, Eggen DA, Malcom GT, Newman WP, Restrepo C. Long-term induction and regression of diet-induced atherosclerotic lesions in rhesus monkeys. I. Morphological and chemical evidence for regression of lesions in the aorta and carotid and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14:958-65.
137. Rozanski A, Blumenthal J, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 1999;99:2192-217.
138. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science.* 2001;294:169-73.
139. Faber BC, Cleutjens KB, Niessen RL, Aarts PL, Boon W, Greenberg AS, et al. Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2001;89:547-54.