

Investigación traslacional cardiovascular

Modelos experimentales de aterosclerosis

Carlos G. Santos-Gallego^a, Juan J. Badimon^a y Borja Ibáñez^{b,c,*}^aAtherothrombosis Resarch Unit, Mount Sinai School of Medicine, Nueva York, Estados Unidos^bCentro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, España^cInstituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España**Palabras clave:**Aterosclerosis
Hipercolesterolemia
Modificación genética
Modelo animal**RESUMEN**

Existen diferentes modelos de aterosclerosis en animales tanto pequeños (roedores) como grandes. La gran ventaja de los animales pequeños es que son de bajo coste, asequibles y de fácil manejo y que hay disponibles modificaciones genéticas relevantes. Los modelos de aterosclerosis en animal grande tienen las desventajas de sus peores asequibilidad y manejo y su coste. Sin embargo, tienen anatomía y fisiología mucho más parecidas a las humanas y los resultados obtenidos son mucho más extrapolables a la patología humana. La elección de uno u otro modelo depende de la naturaleza que se quiera dar a la investigación. En estudios mecanísticos, se puede utilizar con mayor precisión los modelos de roedor, pero para un estudio más traslacional, los modelos de animal grande dan respuestas más cercanas a las de los pacientes. Las técnicas de imagen no invasiva han hecho avanzar mucho el campo del conocimiento de la aterosclerosis a través del estudio seriado de modelos animales ateroscleróticos.

Experimental Models of Atherosclerosis**ABSTRACT**

Today, experimental models of atherosclerosis employ both small (e.g. rodents) and large animals. The main advantages of small animals are their low cost, ready availability, ease of handling and the existence of animals with the appropriate genetic modifications. Models of atherosclerosis in large animals have the disadvantages that they are less readily available, more difficult to handle and more expensive. However, their anatomy and physiology more closely resemble human anatomy and physiology, and experimental observations are much easier to extrapolate to human pathology. The choice of animal model depends on the nature of the research. For example, studies of mechanisms can be carried out with greater precision in rodent models but, for translational studies, responses in large animal models are much closer to human responses. Our understanding of atherosclerosis has increased substantially thanks to serial studies of noninvasive imaging techniques in animal models of the disease.

Keywords:Atherosclerosis
Hypercholesterolemia
Genetically modification
Animal model**INTRODUCCIÓN**

Ignatowski¹ aportó la primera evidencia de aterosclerosis experimental cuando, en 1908, describió que, al alimentar a conejos con dieta rica en proteínas animales (carne, leche, huevos, etc.), se inducía la formación de células (macrófagos) grandes y claras. Sin embargo, fue Anitschkow² el primero en demostrar que la inducción de la aterosclerosis se debía a los lípidos, no a las proteínas; alimentó conejos con yema de huevo y colesterol disuelto en aceite vegetal y comprobó que se producían lesiones ateroscleróticas similares a las presentes en humanos. Desde estos estudios pioneros hasta la actualidad, se ha recorrido un largo camino respecto a los modelos animales de aterosclerosis. En el presente artículo se resumen sucintamente las consideraciones más interesantes acerca de los modelos animales.

PROCESO DE ATEROGÉNESIS

La acumulación de colesterol tiene un papel central en el proceso de aterogénesis. La primera etapa consiste en que, a causa de los factores de riesgo, el endotelio aumenta su permeabilidad (disfunción endotelial, el fenómeno más precoz de la aterogénesis). El colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) penetra en la pared vascular merced al proceso de disfunción endotelial, se une a los proteoglicanos del espacio subendotelial y sufre oxidación. El colesterol oxidado es altamente tóxico, de modo que es fagocitado por los macrófagos de la pared arterial; la presencia de colesterol oxidado desencadena una serie de reacciones proinflamatorias a través de diversos mediadores que perpetúan la inflamación y reclutan más monocitos/macrófagos y células inflamatorias. Al fagocitar los lípidos, los macrófagos se transforman en células espumosas. Se producen cambios secundarios en la media y en la adventicia, con proliferación de células de músculo liso vascular (CML) y aparición de una cubierta fibrótica que protege el núcleo lipídico de la sangre. Cuando los macrófagos no pueden acumular más colesterol, inician el proceso de

*Autor para correspondencia: Laboratorio de Imagen en Cardiología Experimental, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, España.

Correo electrónico: bibanez@cnic.es (B. Ibáñez).

Abreviaturas

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol
 CML: células de músculo liso vascular
 HDL: lipoproteínas de alta densidad
 LDL: lipoproteínas de baja densidad
 RM: resonancia magnética
 VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

apoptosis, y liberan no solo el colesterol nuevamente al espacio subendotelial, sino además sustancias proinflamatorias como factor tisular, citocinas y metaloproteinasas de matriz (las cuales digieren la cubierta fibrosa), lo cual hace a las lesiones más susceptibles a la erosión y la rotura. Cuando la placa se rompe, la sangre entra en contacto con el núcleo lipídico necrótico (altamente trombogénico), lo cual induce la formación de un trombo sobre esa placa, trombo que ocluye la circulación obstruyendo por completo la luz del vaso, lo que desencadena un evento cardiovascular (síndrome coronario agudo o ictus).

MODELOS DE ATEROSCLEROSIS EN RATONES

Clásicamente los estudios con modelos animales se habían llevado a cabo con conejos, cerdos y primates. No obstante, las dificultades de manejo de animales grandes, los gastos que conllevan dichos animales y las consideraciones de carácter ético al usar primates condicionaron el desarrollo de modelos de aterosclerosis en animales más pequeños. Además, el desarrollo tecnológico, con la aparición de ratones modificados genéticamente, hizo que este modelo se extendiera rápidamente.

Ratones silvestres

Los ratones no modificados genéticamente se denominan ratones silvestres (del inglés *wild type mouse*). En los ratones silvestres no se desarrolla espontáneamente la aterosclerosis cuando se los alimenta con la dieta habitual del ratón. Por ello, para iniciar el proceso aterogénico, se necesita elevar la concentración de LDL (cociente HDL/LDL bajo). Esto se consigue con dietas ricas en colesterol.

Los estudios iniciales en ratones se hicieron con dietas hipercolesterolémicas en diversas razas silvestres. El pionero fue Robert Wissler, que usó ácidos biliares para inducir la formación de placas³. Una de las más populares es la dieta Paigen (desarrollada en 1985 por Beverly Paigen^{4,5}), que es una dieta rica en grasa (el 15%, principalmente grasas saturadas derivadas de mantequilla de coco, se suele añadir un 1% de aceite de maíz para suplir la deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados) y en colesterol (1,25%), que además contiene ácido cólico (0,5%). El desarrollo de estría grasa es proporcional a la composición en grasas saturadas. El ácido cólico actúa aumentando la absorción de colesterol (como sal biliar que es) e inhibiendo la excreción de ácidos biliares (inhibe la enzima 7 α -hidroxilasa); no obstante, modernos estudios recomiendan no emplear ácido cólico, pues activa genes implicados en fibrosis hepática⁶.

Paigen estudió la susceptibilidad a la aterosclerosis de diez razas diferentes de ratón tratadas con la dieta Paigen; de menor a mayor susceptibilidad, encontramos: BALB/cJ = C3H/J = A/J = SWR/J = NZB/J (apenas desarrollan) < 129J = AKR/J = DBA/2J < C57L/J < C57BL/6J. La dieta indujo hipercolesterolemia en las diez razas, pero solo aterosclerosis en las cinco últimas; no hubo relación estadística entre hipercolesterolemia y desarrollo de aterosclerosis. Además, incluso en la raza C57BL/6J (la más susceptible) las lesiones se restringían al arco aórtico, eran pequeñas y contenían pocas células.

Por este motivo, se desarrollaron modelos de ratón modificados genéticamente; los primeros en desarrollarse fueron los de ratón *knock out* (KO) para *apoE* y ratón KO para *LDL-R*. Se denomina KO a la ausencia del gen en cuestión. Debemos destacar que ningún modelo murino disponible desarrolla todo el espectro de lesiones presentes en humanos. La mayor parte de los modelos de ratón desarrollan lesiones tipo I y II de la clasificación de la *American Heart Association* (AHA), pero solo un número muy escaso desarrolla lesiones tipo IV. Ningún modelo de ratón desarrolla la rotura o la erosión de placa ni la trombosis que causan los eventos cardiovasculares en humanos. Por ellos, se debe usar los modelos murinos para estudiar depósito lipídico y adhesión de monocitos.

Ratones KO para *apoE*

En 1992, los laboratorios de Breslow⁷ y Maeda⁸, trabajando independientemente, comunicaron a la comunidad científica que habían desarrollado el modelo de ratón KO para *apoE*, en el que las lesiones ateroscleróticas eran muy frecuentes (incluso con dietas normales). A diferencia del ratón silvestre (que solo sufre lesiones —estría lipídica— en la raíz aórtica y con dieta rica en colesterol), el ratón KO para *apoE* adquiere lesiones en todo el árbol arterial⁹, incluso con dieta normal, y dichas lesiones progresan más allá de la estría grasa hasta la placa fibrosa.

En el ratón KO para *apoE*, una dieta tan agresiva como la Paigen no es necesaria (de hecho, este modelo adquiere espontáneamente lesiones incluso con dieta normal). No obstante, una dieta rica en colesterol acelera el desarrollo de la placa y la vuelve aún más rica en lípidos. La dieta más usada en todos los experimentos con ratones es la occidental (*Western diet*, introducida por Plump en el laboratorio de Breslow en 1992)⁷, que contiene un 21% de grasa y el 0,15% de colesterol; de hecho, se ha demostrado que la dieta occidental en ratones KO para *apoE* acelera el desarrollo de la placa sin cambiar las características morfológicas de la lesión⁹.

Los ratones heterocigotos para *apoE* (*ApoE*-/+) no desarrollan aterosclerosis con dieta normal, pero sí con dieta rica en colesterol; sin embargo, el ratón homocigoto *ApoE*-/- sí es significativamente hiperlipémico (2.000 mg/dl) y sufre lesiones 50 veces más extensas que el heterocigoto *ApoE*-/+.

Ratones KO para el receptor de LDL (*LDL-R*)

El otro modelo murino más usado es el de ratón KO para *LDL-R*, creado en el laboratorio de Herz en 1993¹⁰. Comparado con los ratones silvestres, los KO para *LDL-R* presentan altas concentraciones de cLDL (fenotipo muy similar al de los humanos con hipercolesterolemia familiar), pero con dieta normal las lesiones ateroscleróticas se desarrollan muy lentamente. No obstante, al alimentarlos con dieta rica en colesterol incrementan los valores de LDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (se alcanza el nuevo equilibrio lipídico en 2 semanas) y las lesiones se desarrollan en 2-3 meses. La dieta más usada en este modelo es la dieta occidental (el 21% de grasa, el 0,15% colesterol, idealmente suplementada con un 1% de aceite de maíz para obtener ácidos grasos esenciales); de hecho, se ha demostrado que la dieta occidental en ratones KO para *apoE* acelera el desarrollo de la placa sin cambiar las características morfológicas de la lesión⁹.

Tanto el ratón KO para *apoE* como el KO para *LDL-R* son modelos hiperlipémicos, pero los primeros se caracterizan por sufrir lesiones más graves o más complejas que los segundos y porque las lesiones aparecen incluso con dieta normal^{11,12}.

Algunos investigadores prefieren el modelo de ratones KO para *LDL-R* a pesar de sus lesiones más pequeñas y que necesitan dietas especiales, dado que la distribución del colesterol en estos ratones se parece más a la de los humanos, en que la mayor parte del colesterol se moviliza en cLDL. El colesterol en los ratones KO para *apoE* se moviliza principalmente en forma de VLDL.

Tabla 1

Modelos de ratón genéticamente modificados empleados para el desarrollo de aterosclerosis

Ratón	Características de la lesión	Localización de la lesión	Requiere dieta especial	Disponibilidad comercial
<i>Deleciones</i>				
<i>ApoE</i> -/- ⁷⁸	Progresión desde células espumosas hasta núcleos necróticos con cápsula fibrosa	Raíz aórtica, aorta, carótida	No	Jackson
<i>ApoE</i> -/+ ⁶²	Células espumosas sobrecargadas de lípidos	Raíz aórtica	Sí	Taconic
<i>LDL-R</i> -/- ¹⁰	Células espumosas sobrecargadas de lípidos	Raíz aórtica, aorta	Sí	Jackson
<i>Transgénicos</i>				
<i>ApoB</i> - ⁶³	Células espumosas sobrecargadas de lípidos	Raíz aórtica	Sí	Taconic
<i>Apo(a)</i> ⁶⁴	Células espumosas sobrecargadas de lípidos	Raíz aórtica	Sí	
<i>CETP</i> ⁶⁵	Lesiones ricas en lípidos	Raíz aórtica	Sí	Jackson
<i>ApoE</i> (arg112, Cys142) ⁶⁶	Células espumosas sobrecargadas de lípidos	Raíz aórtica	Sí	
<i>ApoE3</i> Leiden ⁶⁷	Células espumosas sobrecargadas de lípidos	Raíz aórtica	Sí	
<i>ApoC-III</i> - ⁶⁸	No definidas	Raíz aórtica	Sí	
<i>Compuestos</i>				
<i>Apobec</i> -/- x <i>LDL-R</i> -/- ⁶⁹	Varía de lesiones con células espumosas a fibrosis e hiperplasia de CML	Raíz aórtica	Sí	

Apo: apolipoproteína; CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol; CML: células de músculo liso vascular; LDL-R: receptor de lipoproteínas de baja densidad. Modificado de Daugherty et al⁶¹, con permiso.

Tabla 2

Fenotipo lipídico de los modelos murinos de aterosclerosis

Modelo murino	Dieta	Colesterol total (mg/dl)	Lipoproteína predominante	Fenotipo de lesión
<i>ApoE</i> -/-	Normal	600	VLDL, IDL	Extensa
<i>LDL-R</i> -/-, <i>Apobec</i> -/-	Normal	400-650	LDL	Extensa, compleja
<i>ApoB</i> - <i>LDL-R</i> -/-	Normal	800	LDL	Extensa, avanzada
<i>LDL-R</i> -/-	Normal	200-300	LDL	Moderada
<i>ApoE</i> -/-	Dieta occidental	1.300-2.000	VLDL, LDL	Extensa, compleja
<i>LDL-R</i> -/- <i>Apobec</i> -/-	Dieta occidental	1.600-1.750	VLDL, LDL	Extensa, compleja
<i>LDL-R</i> -/-	Dieta occidental	1.500-2.000	VLDL, LDL	Extensa
<i>LDL-R</i> -/-	Rica en grasa, ácido cólico	1.880	VLDL, LDL	Extensa
<i>ApoB</i> -	Paigen	310	LDL	Extensa, estría grasa
Silvestres	Paigen	140-190	VLDL, HDL	Escasa, solo en raíz aórtica

Apo: apolipoproteína; LDL-R: receptor de lipoproteínas de baja densidad. Modificado de Getz et al⁶, con permiso.

Modelo de regresión de lesiones en el ratón

Es importante distinguir entre retraso en la progresión de las lesiones y regresión auténtica. Existen dos modelos murinos de regresión de lesiones ya establecidas:

- Trasplante de aorta: consiste en trasplantar un segmento de aorta de un ratón KO para *apoE* a un ratón normal (100 mg/dl). El tamaño de las lesiones trasplantadas se reduce un 50% en unos 3 meses.

- Ratón *apoE/Mx1-Cre*: estos ratones tienen colesterol normal con dieta normal; cuando se les da una dieta con el 16% grasa, el 1,25% de colesterol y el 0,5% de ácido cólico, el colesterol aumenta 1.000 mg/dl.

Consiste en trasplantar parte de la aorta de ratones KO para *apoE* -/- (colesterol, unos 600 mg/dl) a ratones *C57BL/6* con valores lipídicos normales (< 100 mg/dl) (tablas 1 y 2). Ventajas de usar un modelo de ratón: facilidad en el manejo por pequeño tamaño; son baratos (tanto la compra inicial como el mantenimiento); la rapidez en el desarrollo de lesiones. Inconvenientes de usar un modelo de ratón: existen marcadas diferencias entre la placa humana y la del ratón (en este no se dan rotura de placa ni trombosis); el perfil lipídico del ratón

(especialmente el KO para *apoE*, que transporta la mayor parte del colesterol en VLDL) es marcadamente diferente del humano (que transporta la mayor parte del colesterol en LDL); las arterias del ratón son de muy pequeño tamaño, con las consiguientes diferencias en morfología de la pared arterial respecto a los humanos, como una túnica media de espesor mucho menor y falta de *vasa vasorum*; ciertos procedimientos, como la denudación endotelial mediante balón, no han sido exitosos en los vasos murinos.

MODELOS DE ATEROSCLEROSIS EN RATA

La rata es una especie bastante resistente a la aterosclerosis. Igual que el ratón y a diferencia de los humanos, no expresa proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) y el colesterol se transporta en su mayor parte en forma de cHDL. Las ratas generalmente responden poco al colesterol de la dieta, por ello la aterogénesis solo puede inducirse (y en escasa cuantía) con dietas muy ricas en colesterol y grasas que contengan además ácido cólico y tiouracilo. El ácido cólico actúa incrementando la absorción de colesterol y suprimiendo la actividad de 7 α -hidroxilasa (la enzima limitante en la síntesis de ácidos biliares, es decir, en la excreción del colesterol); el tiouracilo

actúa induciendo hipotiroidismo clínico, que reduce el número y la actividad de LDL-R hepáticos (lo que conduce a un incremento en la concentración de LDL).

MODELOS DE ATROSCLEROSIS EN HÁMSTER

En el hámster se desarrollan hipercolesterolemia y aterosclerosis precoz con dietas aterogénicas. Por ejemplo, una dieta de 2 meses con el 0,2% de colesterol y el 10% de aceite de coco produjo en el hámster sirio dorado macho¹³ incremento del colesterol total en un 400%, las VLDL/lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) del 200% y las LDL el 20%, y descenso del 45% en las HDL, así como formación de estría grasa selectivamente en la aorta ascendente. Pese a ello, actualmente no son modelos de uso muy extendido.

MODELOS DE ATROSCLEROSIS EN CONEJOS

Los conejos son un modelo de aterosclerosis usado muy frecuentemente. El conejo más ampliamente usado es el *New Zealand White* (NZW). En el conejo se desarrolla aterosclerosis avanzada, pero se necesita hipercolesterolemia marcada; dado que el conejo absorbe colesterol de manera muy eficiente, se puede inducir estas altas concentraciones de colesterol mediante dieta rica en colesterol.

Ventajas: modelo barato, fácilmente disponible, de fácil manejo, no tiene requerimientos especiales y el perfil lipoproteico es relativamente similar al humano (excepto por deficiencia en lipasa hepática). Inconvenientes: se requiere una hiperlipemia extrema para producir las lesiones, esto produce acumulación de colesterol en corazón, riñones, hígado y pulmones (órganos no afectados por aterosclerosis en humanos); incluso el hígado graso así inducido puede llegar a causar fallo hepático con ictericia, prurito, etc., e incluso muerte durante la fase de inducción.

Modos de inducción de aterosclerosis en conejo

Dieta

Las dietas usadas contienen habitualmente entre el 0,5 y el 2% de colesterol y se administran durante un tiempo variable de 4-16 semanas, dependiendo de la gravedad de la lesión que se quiera alcanzar. A corto plazo, la dieta es relativamente bien tolerada por los conejos, aunque produce gran variedad de tamaños de las lesiones. Las lesiones se producen principalmente en el arco aórtico y la aorta ascendente, y habitualmente no en la aorta abdominal.

El conejo es el único animal que tiene tendencia a sufrir hipercolesterolemia a los pocos días de administración de dieta rica en colesterol (en los primeros 20 días, la concentración se incrementa 2-8 veces)¹⁴. En condiciones de hipercolesterolemia, se forman rápidamente las primeras lesiones (células espumosas, similares a las humanas). Sin embargo, este modelo no se puede mantener a largo plazo, pues la hepatotoxicidad de la dieta acarrea una muy alta mortalidad; además, se trata de una situación no fisiológica, pues la inflamación masiva a medio plazo que se produce en los conejos con dieta muy rica en colesterol a largo plazo no se asemeja a las condiciones en que se desarrolla la aterosclerosis humana (inflamación de bajo grado pero persistente). No obstante, algunos investigadores utilizan este modelo para el estudio de los efectos de los fármacos en la estría grasa; de hecho, nuestro grupo utilizó este modelo para demostrar por primera vez que es posible conseguir la regresión de estría grasa mediante la administración de cHDL purificado de conejo^{15,16}.

Dieta y denudación aórtica

Es el método que ofrece unas lesiones más parecidas a las humanas, motivo por el cual está ampliamente establecido en todo el mundo y es el empleado en nuestro laboratorio¹⁷⁻²⁹. La lesión (única o

doble) con el balón de angioplastia produce denudación de la aorta, lo cual acelera el proceso de formación de lesiones ateroscleróticas y genera unas placas con un núcleo lipídico rodeado por una cubierta fibrosa con gran proliferación de CML. De hecho, estas lesiones son más similares a las humanas que las producidas en conejos solo con dieta rica en colesterol^{30,31}.

Brevemente, el método consiste en inducir lesiones ateroscleróticas aórticas mediante la combinación de 9 meses de dieta rica en colesterol (0,2%) y doble denudación aórtica. La denudación aórtica se lleva a cabo a los 30 días y nuevamente a los 90 días de empezar la dieta rica en colesterol; se realiza una disección anatómica de la región inguinal para exponer la arteria femoral, se canula la arteria femoral, con guía fluoroscópica se sube un balón Fogarty de 4 Fr hasta el arco aórtico, se infla el balón y se retira suavemente, con lo que se produce la denudación del endotelio de la aorta desde el arco aórtico hasta la iliaca. Las lesiones así generadas son muy similares a las humanas, pues no solamente presentan células espumosas, sino además importante componente de fibrosis y proliferación de CML.

Variantes genéticas

El modelo principal es el conejo Watanabe con hiperlipemia heredable (WHHL). En 1980, Watanabe reportó una cepa creada a partir de un único conejo hipercolesterolémico³². Actualmente se sabe que los conejos Watanabe tienen un defecto en *LDL-R*; es decir, un modelo que remeda la hipercolesterolemia familiar (hiperlipoproteinemia hereditaria tipo IIa de Frederickson). Desde entonces, es uno de los modelos más estudiados, tanto para el metabolismo de lipoproteínas como para el desarrollo de aterosclerosis o el efecto de diversos fármacos (principalmente estatinas). Aparecen lesiones en todos los estadios de progresión, desde estría lipídica a placas avanzadas. Las lesiones se concentran en las coronarias y la aorta, y los lípidos se acumulan tanto en las células espumosas como en CML.

En los conejos Watanabe se desarrolla una doble alteración: *a*) deficiencia de *LDL-R*, que produce hipercolesterolemia, y *b*) altas concentraciones de VLDL y bajas de HDL, junto con acumulación de grasa visceral e hiperinsulinemia, que remedan el síndrome metabólico humano. Esto causa que se desarrolle tanto aterosclerosis como infarto agudo de miocardio (IAM), alteraciones valvulares, xantomas³³, etc. Las principales diferencias en el metabolismo lipídico entre los conejos Watanabe, los humanos con hipercolesterolemia familiar y los ratones KO para *apoE* y *LDL-R* se resumen en la tabla 3.

No obstante, en los conejos descritos inicialmente por Watanabe se desarrollaba aterosclerosis aórtica, pero no coronaria. Con cría selectiva se desarrollaron conejos que sufren aterosclerosis coronaria³⁴. Otra modificación posterior es el desarrollo de conejos WHHL propensos al IAM (WHHLMI)³⁵, en los que se observa aterosclerosis coronaria ya a los 2 meses; a los 20 meses, estenosis del 70%; a los 20 meses, estenosis del 90%, y a los 30 meses, IAM en el 97% de los casos, con lesiones muy similares a las humanas y calcificación y hemorragia en la placa.

La raza del Hospital St. Thomas (STH) tiene un perfil lipídico similar al de los pacientes que sufren hipertrigliceridemia e hiperlipemia combinada, y asimismo contrae aterosclerosis^{36,37}.

La morfología de la placa se ve influida por la composición y la duración de la dieta³⁸. Dietas de corta duración y más del 2% de colesterol en la dieta causan lesiones ricas en células espumosas. Dietas con bajo porcentaje de colesterol (0,1-0,2%) pero mantenidas durante largo tiempo originan lesiones más similares a las humanas, con mayor porcentaje de tejido fibroadiposo¹⁴. Con un aporte superior al 0,15%, ya se detectan ésteres de colesterol en la placa.

La localización de las lesiones en el modelo de lesión + dieta es selectivo en el punto de la aorta donde se produce la denudación endotelial (casi siempre en la aorta descendente). En el modelo de dieta, las lesiones se localizan en arco aórtico, la aorta torácica en la salida de las arterias intercostales y, en menor cuantía, en la aorta abdominal.

Tabla 3Diferencias en el metabolismo lipídico y sus complicaciones entre humanos con hipercolesterolemia familiar (HF), conejo Watanabe y ratones *knock out* para *apoE* y *LDL-R*

	Ratones KO <i>apoE</i>	Ratones KO <i>LDL-R</i>	Conejos Watanabe	Humanos con HF
Concentración de colesterol	Moderada-alta (con dieta occidental)	Moderada-alta (con dieta occidental)	Extremadamente alta (espontáneamente)	Extremadamente alta (espontáneamente)
Principal lipoproteína en plasma	VLDL	LDL y HDL	LDL	LDL
LDL	Moderado	Moderado		
HDL	Bajo	Alto	Bajo	Bajo
apoB de VLDL	apoB48	apoB48 y B100	B100	B100
Expresión de apoB en hígado	Sí	Sí	No	No
Actividad de CETP en plasma	No	No	Sí	Sí
Aterosclerosis coronaria	Resistente	Resistente	Grave	Grave
Características de aterosclerosis coronaria	No se desarrolla	No se desarrolla	Lesiones complicadas	Lesiones complicadas
Características de aterosclerosis aórtica	Estría lipídica	Estría lipídica	Lesiones complicadas	Lesiones complicadas
Infarto agudo de miocardio	Resistentes	Resistentes	Espontáneo	Espontáneo

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HF: hipercolesterolemia familiar; KO: *knock out*; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LDL-R: receptor de lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Modificado de Shioimi et al³³, con permiso.

Métodos para cuantificar la aterosclerosis en conejo

- Cuantificar las células espumosas (teñidas con *Oil Red O*) en la pared de la arteria.

- Extensión de lesiones con Sudan IV en aorta en face.

- Inmunohistoquímica (IH): permite cuantificar determinados marcadores. Así, por ejemplo, para cuantificar CML, realizaremos IH para detectar α -actina; si nuestro objetivo es los macrófagos, IH con RAM 11. Así, por ejemplo, nuestro grupo demostró que la inyección de apoA-I Milano a un modelo de aterosclerosis de conejo con doble denudación aórtica y dieta al 0,2% de colesterol facilitaba la regresión de la placa y la estabilizaba (disminuyó el porcentaje de células teñidas con RAM 11 y aumentó el de células teñidas con α -actina).

- Técnicas no invasivas de evaluación, como angiografía por tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM). Ampliamente utilizada por nuestro grupo¹⁷⁻²⁹, permite evaluar el tamaño de placa de manera no invasiva. Se puede usar para estudios de progresión y regresión de placa, pues permite realizar varios estudios de manera seriada (es decir, monitorizar la respuesta con el paso del tiempo). De esta manera, cada animal es su propio control, lo que permite reducir de manera significativa el tamaño muestral.

Nuestro grupo usa una RM de 1,5 T y un *coil* convencional para extremidades. Se usan secuencias de ecografía de gradiente en cortes coronales y sagitales para localizar exactamente la aorta abdominal. A continuación, se realizan cortes secuenciales en el plano transversal (3 mm de espesor, sin separación entre cortes) desde la salida del tronco celiaco a la bifurcación de las iliacas. Las imágenes inicial y final se identifican usando las distancias desde las arterias renales y la bifurcación iliaca, para obtener datos de cortes secuenciales. Se analizan los 5 cm de la aorta inmediatamente tras el tronco celiaco. Mediante un programa de cuantificación de imágenes (Image J o Image Pro Plus), se cuantifican el área luminal y el área total; área de pared vascular = área total vascular – área luminal. Volumen de placa = área de pared vascular \times 3 (pues los cortes son de 3 mm de espesor). Se analiza la media de las medidas. Las figuras 1 y 2 muestran ejemplos del modelo de aterosclerosis en conejo.

MODELOS DE ATEROSCLEROSIS EN CERDOS

Gottlieb fue el primero en comprobar en cerdo la presencia de aterosclerosis con engrosamiento intimal en arterias coronarias³⁹. Gené-

ticamente, el cerdo está relativamente próximo al humano, lo cual también se aplica a la anatomía y la fisiología del sistema cardiovascular y la respuesta a la hipercolesterolemia.

El cerdo doméstico (*Sus scrofa*) es el más usado en investigación cardiovascular. Alcanza la madurez sexual a los 6-8 meses, cuando su peso varía entre 40 y 100 kg. El corazón del cerdo es anatómicamente similar al humano, con la excepción de que el *ostium* de la coronaria derecha está más craneal, que la vena ácigos izquierda permite el drenaje del sistema intercostal en el seno coronario, que es algo más proclive al vasospasmo y que no tiene colaterales⁴⁰.

Ventajas: las lesiones son muy similares a las humanas, con acumulación de células espumosas, grasa extracelular, proliferación de CML, etc.; el perfil lipídico del cerdo es muy similar al humano, con la mayor parte del colesterol circulando en LDL y lipoproteínas en concentraciones y tamaños muy similares a las humanas; la única diferencia es que el cerdo no expresa apolipoproteína II (que supone el 20% del componente en apolipoproteínas del HDL); la anatomía cardiovascular es muy similar a la humana; la distribución de las lesiones es muy similar a la humana y predominan en aorta, coronarias y carótidas; las lesiones se desarrollan con dieta hipercolesterolémica; en general, se desarrollan estrías grasas a los 6 meses de edad y las lesiones avanzadas, en cerdos mayores de 1 año, con la única salvedad de que no se desarrolla trombosis; si se realiza la combinación de doble denudación aórtica y dieta hipercolesterolémica, las lesiones son aún más similares a las humanas⁴¹; los cerdos son omnívoros.

Inconvenientes: elevado gasto, dificultad de manejo y de almacenamiento; inducción aterosclerótica en tiempo relativamente largo; el cerdo habitualmente tiene concentraciones de cLDL relativamente bajas, por lo que no aparecen lesiones espontáneamente (colesterol total, 100 ± 8 mg/dl; cLDL, 55 ± 8 mg/dl; cHDL, 36 ± 6 mg/dl; triglicéridos, 49 ± 4 mg/dl)⁴²; no obstante, cuando se lo alimenta con dieta rica en colesterol, se desarrollan hipercolesterolemia (300 mg/dl aproximadamente) y lesiones ateroscleróticas similares a las humanas. No obstante, los tiempos de inducción son largos (9-12 meses) y las complicaciones de la placa (infarto, trombo), aunque descritas en la literatura, no son muy frecuentes. La tabla 4 muestra diversos modelos de inducción de aterosclerosis en el cerdo. Por ello, mediante selección, reproducción y cría adecuadas, se han desarrollado diversos modelos muy sensibles a la manipulación dietética con tiempos de inducción más cortos.

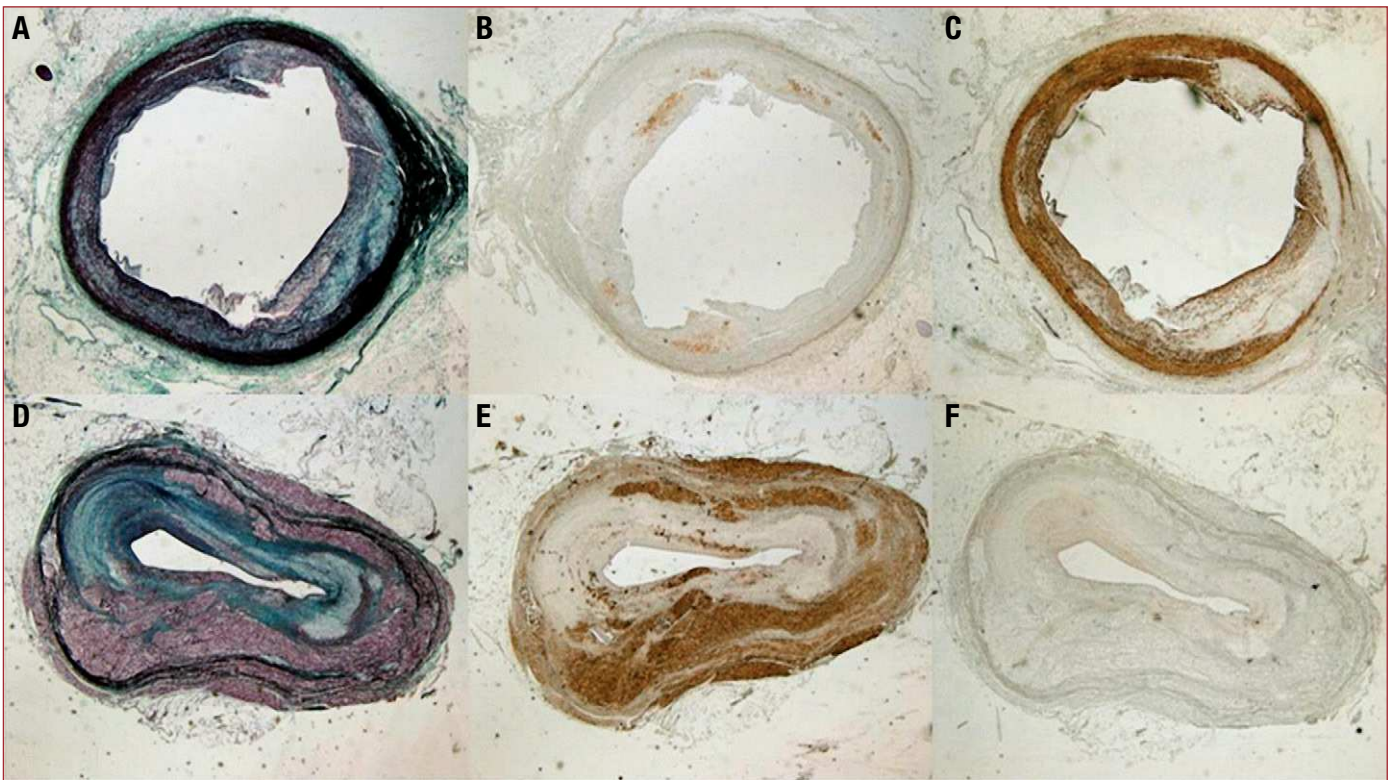


Figura 1. Ejemplos de lesiones tratadas con apoA-I Milano (A-C) y con placebo (D-F) en un modelo de conejo de dieta rica en colesterol y doble denudación aórtica. A y D: tinción con tricrómico de Masson; obsérvese que en A la estenosis es mucho menor que en D y con mayor proporción de colágeno (color púrpura) respecto al total de la placa que en D. B y E: inmunohistoquímica con RAM 11 (marcador de macrófagos); obsérvese que en A apenas hay macrófagos en la sección, mientras en E la infiltración de macrófagos es muy grande. C y F: inmunohistoquímica con actina (marca CML); obsérvese que la proporción de CML en C es mucho mayor que en F. En conclusión, la primera placa (A-C, tratada con apoA-I Milano) es mucho más estable (menos estenosis e infiltración macrofágica, mayor proporción de CML y de colágeno) que la segunda placa (D-E, placebo, más estenosis e infiltración macrofágica, menor proporción de colágeno y CML).

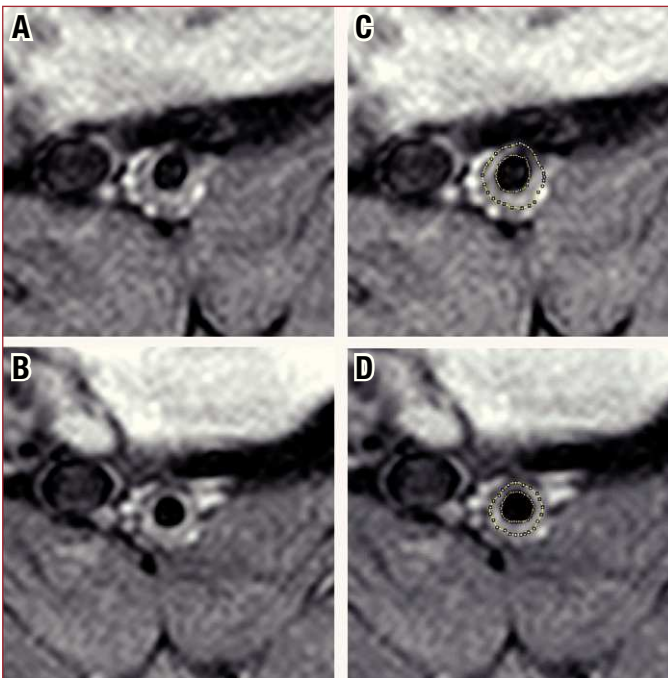


Figura 2. Evaluación mediante resonancia magnética (RM) de la regresión de la placa aterosclerótica en un conejo tras inyección de apoA-I Milano. Imágenes de RM antes (A) y después (B) del tratamiento (tomadas al mismo nivel de la aorta abdominal). C y D: las mismas imágenes que A y B, pero resaltando el autotrazado de la luz y el área total del vaso. Las mediciones por RM nos permiten cuantificar que en este segmento el tratamiento ha producido una regresión del 20,44% de la placa tras dos dosis de apoA-I Milano. Imagen obtenida de Ibanez et al²⁷, con permiso del propietario del copyright.

Cerdo con hipercolesterolemia hereditaria

Se ha desarrollado otra raza especial, *inherited hyperlipoproteinemia and hipercolesterolemia* (IHLC), en la que aparecen espontáneamente (con dieta normal) hipercolesterolemia, tasa de catabolismo de LDL reducida y aterosclerosis acelerada (incluso con hemorragia en la placa)^{43,44} debido a mutaciones en *LDL-R*.

A los 12 meses, los estadios iniciales de la lesión ya aparecen (macrófagos cargados de lípidos); las lesiones progresan rápidamente en 12-18 meses (principalmente en aorta torácica y bifurcación aortoiliaca); a las 24 meses hay lesiones complicadas (capa fibrosa fina, núcleo necrótico, calcificación, neovascularización) en casi todas las arterias, incluidas las coronarias; se ha descrito a los 36 meses presencia de muy abundante neovascularización, hemorragia en la placa y rotura de placa.

Las lesiones desarrolladas son similares a las humanas (estenosis, núcleo necrótico, neovascularización marcada), pero su principal inconveniente es que el tiempo de inducción es largo (12-18 meses, con el problema de manejo de cerdos que pueden llegar a superar 200 kg de peso). La figura 3 muestra ejemplos de lesiones ateroscleróticas en cerdo.

Modelo porcino con diabetes mellitus e hipercolesterolemia

La combinación de diabetes mellitus (DM) e hipercolesterolemia en el cerdo Yorkshire induce lesiones ateroscleróticas en aorta, coronarias y arterias femorales en unas 20 semanas^{45,46}. La DM se induce mediante administración intravenosa de estreptozotocina, que destruye más del 80% de las células beta pancreáticas). La dieta rica en colesterol acelera la aterogénesis (de hecho, en los cerdos diabéticos con dieta normal no se desarrollan lesiones).

Tabla 4

Métodos para desarrollar aterosclerosis en el cerdo

	DRC	HF+dieta normal	DM+DRC	Lesión+DRC
Localización anatómica	Coronarias, aorta, iliofemoral	Coronarias, aorta, iliofemoral	Coronarias, aorta, iliofemoral	Dependiendo de dónde se realice la lesión
Lesiones avanzadas	2 años	12-18 meses	6-9 meses	9-12 meses
Ventajas	Fácil, disponible universalmente	Dieta normal, endógeno HS	Inducción rápida, escasa ganancia peso	Localización predecible, inducción rápida
Limitaciones	Modelo a largo plazo, dieta cara, tamaño muy grande	Modelo a largo plazo, disponibilidad limitada, tamaño muy grande	Caro (estreptozotocina, cuidado de DM), no a corto plazo, dificultad para crecer	Complicado, procedimientos intervencionistas costosos, no a corto plazo

DM: diabetes mellitus; DRC: dieta rica en colesterol; HF: hipercolesterolemia familiar.

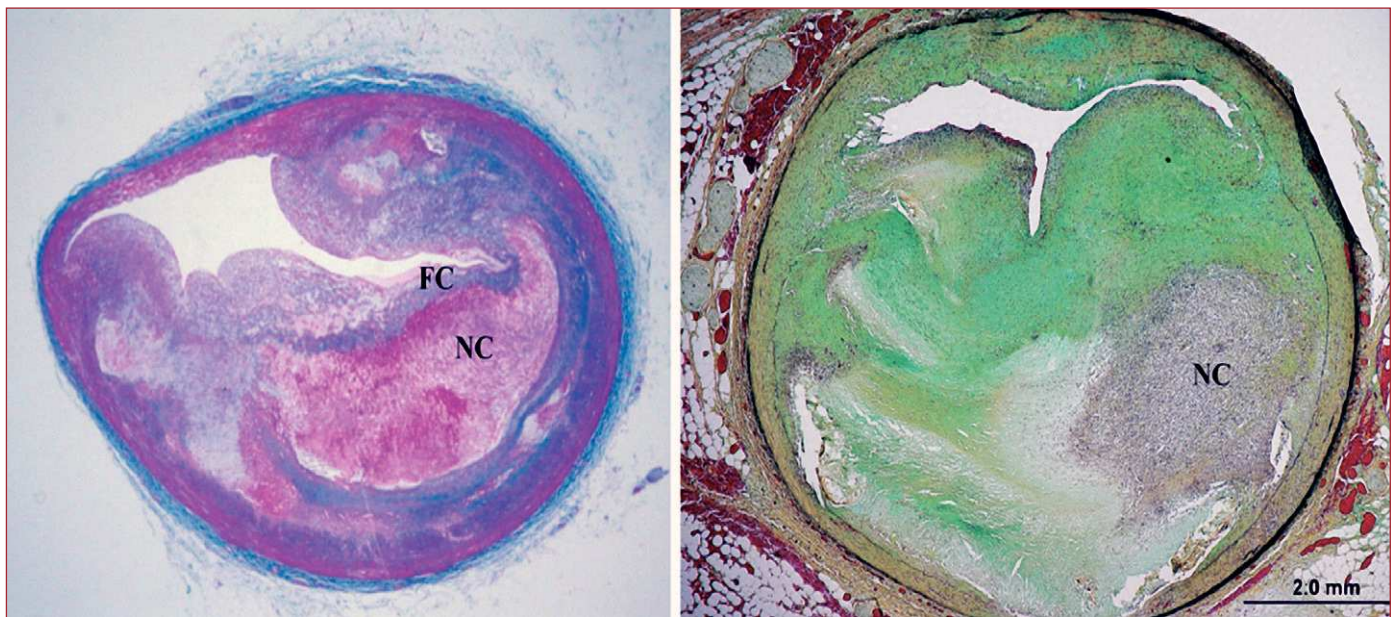
Adaptado de Granada et al⁴⁰, con permiso.

Figura 3. Lesiones similares a las humanas en el modelo de cerdo con hipercolesterolemia familiar (IHLC)⁴⁰. A la izquierda, placa con núcleo necrótico (NC) y recubrimiento fibroso fino (FC); el colágeno se ve en azul (tricroómico de Masson). A la derecha, placa complicada que contiene colágeno (en verde, pentacrómico de Movat), calcificación, lípidos, inflamación y núcleo necrótico (NC).

A los 3 meses ya aparecen estrías grasas; a los 6 meses, el 96% de las arterias tienen lesiones, y el 100% a los 9 meses (el 19% con fibroateroma y el 11% de calcificación). En este modelo predominan las lesiones en las coronarias, ilíacas y otras arterias periféricas, y son menos frecuentes en carótidas y aorta; en las coronarias, las lesiones más graves tienen una distribución similar que en humanos, en el territorio proximal y cerca de bifurcaciones. En este modelo se testó el efecto de darapladib, un inhibidor selectivo de Lp-PLA2 del que se ha demostrado que reduce el desarrollo de aterosclerosis y núcleo necrótico⁴⁷.

Una ventaja de este modelo es que los cerdos diabéticos ganan peso más lentamente que los cerdos normales o hipercolesterolémicos. Los inconvenientes residen en el precio y las complicaciones médicas de la DM que pueden sufrir los cerdos si no se monitorizan adecuadamente (hipoglucemia e hiperglucemia, gastroparesia, infecciones) (fig. 4).

Cerdos en miniatura

El problema del tamaño se puede superar parcialmente empleando minicerdos, más económicos y con alta susceptibilidad a sufrir aterosclerosis inducida por dieta. La raza más usada es el cerdo en miniatura de raza Yucatán⁴⁸⁻⁵¹; asimismo se han descrito modelos con las razas Göttingen, Hanford y Sinclair Hornell, pero la información es mucho menor. Se suelen requerir dietas muy ricas en colesterol para

inducir aterosclerosis en minicerdos⁵² o inducción de DM con estreptozotocina. En el cerdo de Yucatán (pequeño y dócil) se desarrollan lesiones complicadas similares a las humanas, con necrosis, cristales de colesterol y calcificaciones. Muy recientemente se han comunicado avances que pueden cambiar sustancialmente el panorama en este campo (véase «Adenda»).

Modelo de lesión vascular + dieta hipercolesterolémica

Para disminuir el tiempo de inducción de las lesiones y reducir el coste del mantenimiento del cerdo, se han desarrollado modelos de aterogénesis mediante la combinación de dieta rica en colesterol y producción de lesión vascular localizada (denudación endotelial mediante guía⁵³, inflado de balón endovascular⁵⁰, ligamiento parcial de la carótida⁵⁴).

Una técnica útil descrita recientemente es la inyección de solución lipídica directamente en la pared de los vasos del cerdo hipercolesterolémico^{55,56}, lo cual crea a los 12 meses lesiones excéntricas, con remodelado positivo, cubierta fibrosa fina, núcleo necrótico y abundante neovascularización. Se alimenta al cerdo con dieta rica en colesterol (el 2% de colesterol, el 20% de grasa, el 1,5% de colato sódico), se lo somete a un inflado de balón de angioplastia y, 2 semanas después, se inyecta una mezcla de liposomas que contienen ésteres de colesterol y LDL humana oxidada.

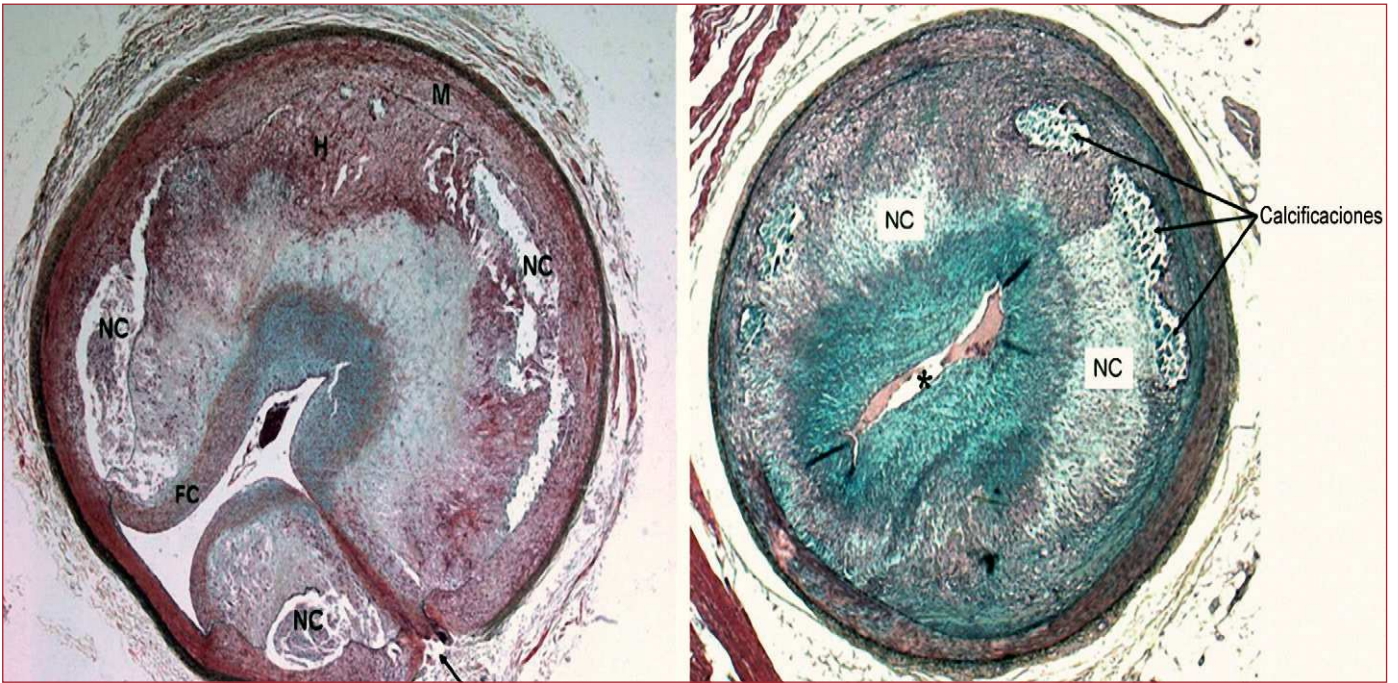


Figura 4. Lesiones avanzadas en un modelo de cerdo diabético e hipercolesterolémico⁴⁰. A la izquierda, placa aterosclerótica compleja, que contiene hemorragia (H), núcleo necrótico (NC) y fino recubrimiento fibroso (NC). A la derecha, placa complicada con estenosis muy avanzada, núcleo necrótico (NC) y calcificaciones.



Figura 5. Placa en la arteria descendente anterior de un cerdo sometido a inyección de lípidos en la pared vascular 10 semanas antes. En esta tinción con el pentacrómico de Movat, se observa una placa fibrolipídica⁵⁶.

La principal ventaja del modelo es que la distribución anatómica de las lesiones es predecible, únicamente se desarrollarán donde hayamos producido la lesión vascular (que será selectivamente en el territorio que más interese). El principal inconveniente es la complejidad de inducir la lesión vascular (fig. 5, tabla 4).

MODELOS DE ATEROSCLEROSIS EN PRIMATES

Dado que es el animal más similar al ser humano en la escala filogenética, es un modelo muy atractivo, pues se podrá aplicar los hallazgos más directamente al ser humano. Los primates americanos en general no se usan porque se desarrollan lesiones discordantes, con distribución anatómica diferente de la del hombre. Los más usados son los primates africanos porque tras dieta hipercolesterolémica se desarrollan lesiones en localizaciones anatómicas muy similares a las humanas. Por ejemplo, el mono *Rhesus* es el más estudiado, con las ventajas de un tamaño adecuado y unas lesiones ya bien caracterizadas. Similares ventajas comparten los monos *Cynomolgus*.

Ya en los años cincuenta, se consiguió inducción de aterosclerosis en monos con dieta rica en colesterol⁵⁷, incluso con aparición de IAM⁵⁸. Dicha dieta puede inducir lesiones en la aorta y todas sus ramas, incluidas las arterias coronarias. Recientemente se ha descrito un modelo de mono *Rhesus* con deficiencia familiar de *LDL-R*^{59,60}.

Ventajas: filogenéticamente similares a los humanos; son omnívoros; las lesiones son similares a las humanas, con alto porcentaje de proliferación de músculo liso y complicaciones (trombos, infartos, etc.).

Inconvenientes: elevado precio, mantenimiento caro, escasa disponibilidad, animalarios especiales, problemas éticos.

ADENDA

En el lapso entre la redacción de este artículo y la revisión de las pruebas, se ha publicado por primera vez la creación de un modelo de cerdo Yucatán modificado genéticamente para expresar la proteína mutante humana PCSK9 (causa de la hipercolesterolemia familiar).

Este cerdo enano desarrolla espontáneamente hipercolesterolemia, y cuando se lo alimenta con dieta grasa, sufre un proceso aterosclerótico muy similar al de los humanos⁷⁰.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- Ignatowski AC. Influence of animal foods and the study of atherosclerosis on the organism of rabbits. *S Peterb Izvst Imp Voenoo-Med Akad.* 1908;16:154-73.
- Anitschow A. Über Veränderungen der Kaninchen-Aorta bei Experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Z Path Anat U Z Allg Path.* 1913;56:379-84.
- Wissler RW. The production of atheromatous lesions in the albino rat. *Proc Inst Med Chic.* 1952;19:79-80.
- 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.
- Paigen B, Havens MB, Morrow A. Effect of 3-methylcholanthrene on the development of aortic lesions in mice. *Cancer Res.* 1985;45:3850-5.
- Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:242-9.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992;71:343-53.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468-71.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:133-40.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92:883-93.
- Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1006-14.
- Catanozzi S, Rocha JC, Passarelli M, Chiquito FC, Quintao EC, Nakandakare ER. Pitfalls in the assessment of murine atherosclerosis. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42:471-5.
- Nikkari ST, Solakivi T, Jaakkola O. The hyperlipidemic hamster as an atherosclerosis model. *Artery.* 1991;18:285-90.
- 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.
- Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V. High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Lab Invest.* 1989;60:455-61.
- Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest.* 1990;85:1234-41.
- Worthley SG, Helft G, Fuster V, Zaman AG, Fayad ZA, Fallon JT, et al. Serial in vivo MRI documents arterial remodeling in experimental atherosclerosis. *Circulation.* 2000;101:586-9.
- Helft G, Worthley SG, Fuster V, Zaman AG, Schechter C, Osende JJ, et al. Atherosclerotic aortic component quantification by noninvasive magnetic resonance imaging: an in vivo study in rabbits. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1149-54.
- 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;105:993-8.
- Worthley SG, Helft G, Fuster V, Fayad ZA, Shinnar M, Minkoff LA, et al. A novel nonobstructive intravascular MRI coil: in vivo imaging of experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:346-50.
- Corti R, Osende JJ, Fallon JT, Fuster V, Mizsei G, Jneid H, et al. The selective peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonist has an additive effect on plaque regression in combination with simvastatin in experimental atherosclerosis: in vivo study by high-resolution magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:464-73.
- Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J.* 2004;25:1197-207.
- Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Corti R, Valdiviezo C, Hutter R, Corda S, et al. Atherosclerosis regression and TP receptor inhibition: effect of S18886 on plaque size and composition—a magnetic resonance imaging study. *Eur Heart J.* 2005;26:1557-61.
- Corti R, Osende J, Hutter R, Viles-Gonzalez JF, Zafar U, Valdiviezo C, et al. Fenofibrate induces plaque regression in hypercholesterolemic atherosclerotic rabbits: in vivo demonstration by high-resolution MRI. *Atherosclerosis.* 2007;190:106-13.
- Choi BG, Vilahur G, Cardoso L, Fritton JC, Ibanez B, Zafar MU, et al. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:211-7.
- Choi BG, Vilahur G, Zafar MU, Cardoso L, Yadegar D, Ibanez B, et al. Selective estrogen receptor modulation influences atherosclerotic plaque composition in a rabbit menopause model. *Atherosclerosis.* 2008;201:76-84.
- Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, Speidl WS, Pinero A, Choi BG, et al. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1104-9.
- Ibanez B, Cimmino G, Benezet-Mazuecos J, Santos-Gallego CG, Pinero A, Prat-Gonzalez S, et al. Quantification of serial changes in plaque burden using multi-detector computed tomography in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2009;202:185-91.
- Giannarelli C, Cimmino G, Connolly TM, Ibanez B, Garcia Ruiz JM, Alique M, et al. Synergistic effect of liver X receptor activation and simvastatin on plaque regression and stabilization: an magnetic resonance imaging study in a model of advanced atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2012;33:264-73.
- Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation.* 1998;97:2433-44.
- Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, Shing H, Nagai R, Schoen FJ, et al. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res.* 1998;83:1015-26.
- Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis.* 1980;36:261-8.
- Shiomi M, Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: a tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis.* 2009;207:1-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nordestgaard BG, Lewis B. Intermediate density lipoprotein levels are strong predictors of the extent of aortic atherosclerosis in the St. Thomas's Hospital rabbit strain. *Atherosclerosis.* 1991;87:39-46.
- Kolodgie FD, Katocs AS Jr, 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.
- Gottlieb H, Lalich JJ. The occurrence of arteriosclerosis in the aorta of swine. *Am J Pathol.* 1954;30:851-5.
- Granada JF, Kaluza GL, Wilensky RL, Biedermann BC, Schwartz RS, Falk E. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *EuroIntervention.* 2009;5:140-8.
- Fritz KE, Daoud AS, Augustyn JM, Jarmolych J. Morphological and biochemical differences among grossly-defined types of swine aortic atherosclerotic lesions induced by a combination of injury and atherogenic diet. *Exp Mol Pathol.* 1980;32:61-72.
- Hackman AM, Pond WG, Mersmann HJ, Wong WW, Krook LP, Zhang S. Obese pigs fed a high cholesterol diet from birth to 2 months are less susceptible than lean pigs to atherosclerosis. *J Nutr.* 1996;126:564-73.
- 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.
- Hasler-Rapacz J, Ellegren H, Fridolfsson AK, Kirkpatrick B, Kirk S, Andersson L, et al. Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *Am J Med Genet.* 1998;76:379-86.
- Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes.* 2001;50:1654-65.
- Mohler ER 3rd, Sarov-Blat L, Shi Y, Hamamdizic D, Zalewski A, Macphee C, et al. Site-specific atherogenic gene expression correlates with subsequent variable lesion development in coronary and peripheral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:850-5.
- Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER 3rd, Hamamdizic D, Burgert ME, Li J, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat Med.* 2008;14:1059-66.
- Reitman JS, Mahley RW, Fry DL. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1982;43:119-32.
- Barbeau ML, Klemp KF, Guyton JR, Rogers KA. Dietary fish oil. Influence on lesion regression in the porcine model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:688-94.
- De Smet BJ, Van der Zande J, Van der Helm YJ, Kuntz RE, Borst C, Post MJ. The atherosclerotic Yucatan animal model to study the arterial response after balloon angioplasty: the natural history of remodeling. *Cardiovasc Res.* 1998;39:224-32.
- Gal D, Rongione AJ, Slovenkai GA, DeJesus ST, Lucas A, Fields CD, et al. Atherosclerotic Yucatan microswine: an animal model with high-grade, fibrocalcific, nonfatty lesions suitable for testing catheter-based interventions. *Am Heart J.* 1990;119:291-300.
- Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:415-22.
- Mihaylov D, Van Luyn MJ, Rakhorst G. Development of an animal model of selective coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis.* 2000;11:145-9.

54. Ishii A, Vinuela F, Murayama Y, Yuki I, Nien YL, Yeh DT, et al. Swine model of carotid artery atherosclerosis: experimental induction by surgical partial ligation and dietary hypercholesterolemia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006;27:1893-9.
55. Granada JF, Moreno PR, Burke AP, Schulz DG, Raizner AE, Kaluza GL. Endovascular needle injection of cholesteryl linoleate into the arterial wall produces complex vascular lesions identifiable by intravascular ultrasound: early development in a porcine model of vulnerable plaque. *Coron Artery Dis.* 2005;16:217-24.
56. Granada JF, Wallace-Bradley D, Win HK, Alviar CL, Builes A, Lev EI, et al. In vivo plaque characterization using intravascular ultrasound-virtual histology in a porcine model of complex coronary lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:387-93.
57. Taylor CB, Cox GF, Hall-Taylor BJ, Nelson LG. Atherosclerosis in areas of vascular injury in monkeys with mild hypercholesterolemia. *Circulation.* 1954;10:613.
58. Taylor CB, Cox GE, Yogi N. Fatal myocardial infarction in rhesus monkey with diet-induced hypercholesterolemia. *Am J Pathol.* 1959;35:674.
59. Scanu AM, Khalil A, Neven L, Tidore M, Dawson G, Pfaffinger D, et al. Genetically determined hypercholesterolemia in a rhesus monkey family due to a deficiency of the LDL receptor. *J Lipid Res.* 1988;29:1671-81.
60. 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.
61. Daugherty A, Whitman SC. Quantification of atherosclerosis in mice. *Methods Mol Biol.* 2003;209:293-309.
62. Van Ree JH, Van den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 1994;111:25-37.
63. Purcell-Huynh DA, Farese RV Jr, Johnson DF, Flynn LM, Pierotti V, Newland DL, et al. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest.* 1995;95:2246-57.
64. Lawn RM, Wade DP, Hammer RE, Chiesa G, Verstuyft JG, Rubin EM. Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *Nature.* 1992;360:670-2.
65. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature.* 1993;364:73-5.
66. Fazio S, Sanan DA, Lee YL, Ji ZS, Mahley RW, Rall SC Jr. Susceptibility to diet-induced atherosclerosis in transgenic mice expressing a dysfunctional human apolipoprotein E(Arg 112,Cys142). *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1873-9.
67. Van Vlijmen BJ, Van den Maagdenberg AM, Gijbels MJ, Van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, et al. Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Clin Invest.* 1994;93:1403-10.
68. Masucci-Magoulas L, Goldberg IJ, Bisgaier CL, Serajuddin H, Francone OL, Breslow JL, et al. A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. *Science.* 1997;275:391-4.
69. Powell-Braxton L, Veniant M, Latvala RD, Hirano KI, Won WB, Ross J, et al. A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat Med.* 1998;4:934-8.
70. Al-Mashhadi RH, Sorensen CB, Kragh PM, Christoffersen C, Mortensen MB, Tolbod LP, et al. Familial hypercholesterolemia and atherosclerosis in cloned minipigs created by DNA transposition of a human PCSK9 gain-of-function mutant. *Sci Transl Med.* 2013;5:166ra1.