Rev Fed Arg Cardiol. 2014; 43(4): 176-181

Artículo Original

Hallazgos bioquímicos y ateroescleróticos en una colonia de ratonesdeficientes en apolipoproteina E. ¿Un modelo posible?

Biochemical changes and aortic atherosclerosis in a colony ofapolipoprotein-e deficient mice. A possible model?

Aída Aguilera, Matilde Otero-Losada, Gabriel Cao, Enriqueta Serafini, Angélica Muller, Francisco Azzato, José Milei

Instituto de Investigaciones Cardiológicas. Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. ININCA. UBA. CONICET Argentina.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido el 1 de junio de 2014
Aceptado después de revisión el 18 de agosto de 2014
Online el 30 de noviembre de 2014
www.fac.org.ar/revista

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Palabras clave:
ApoE$^{-/-}$
Aterosclerosis
Hipertrigliceridemia
Aorta
Hígado

RESÚMEN

Objetivo: Estudiar la secuencia temporal de cambios bioquímicos y patológicos a nivel hepático y aórtico, en ratones deficientes en apoliproteína-E (8 semanas de edad, dieta estándar).
Métodos: A las 16, 20 y 30 semanas de edad se practicó eutanasia (difenilhidantoína y pentobarbital sódicos). Se determinaron glucemia, niveles de colesterol total y sus fracciones de alta y baja densidad (métodos bioquímicos rutinarios). Se obtuvieron secciones de hígado y aorta ascendente y se procesaron convencionalmente para morfología y morfometría.
Resultados: Se observó hiperglucemia (20 semanas, 39%, p<0.02), hipertrigliceridemia (x 2.8, p<0.01), aumento de colesterol no-HDL (71%, p<0.05) y disminución de HDL (-26%, p<0.05) a las 30 semanas. La inflamación hepática aumentó (x4, p<0.01) y la inflamación portal se duplicó (p<0.03) (semanas 20-30). En la semana 30: el área de placa aórtica se quintuplicó (p<0.0001), el porcentaje de estenosis aumentó (x 2.4, p<0.01), la relación íntima-media se triplicó (p<0.05) con adelgazamiento de la media (-69%, p<0.01). La lesión preaterosclerótica consistió en acumulaciones subendoteliales de células espumosas a diferencia del humano en el que el engrosamiento intimal es a expensas de proliferación de células musculares lisas.
Conclusiones: Los ratones ApoE$^{-/-}$ desarrollaron hiperglucemia temprana, seguida de dislipidemia con predominio de hipertrigliceridemia, y patología hepática y aórtica. La cinética de los cambios sugiere que la hipertrigliceridemia, el descenso de HDL y la inflamación hepática favorecieron la progresión del daño aórtico. Aún cuando la secuencia de eventos es distinta a la observada en el humano, este modelo es útil para estudiar mecanismos bioquímicos y moleculares en aterosclerosis.

Biochemical changes and aortic atherosclerosis in a colony ofapolipoprotein-e deficient mice. A possible model?

Keywords:
ApoE$^{-/-}$
Atherosclerosis
Hypertriglyceridemia
Aorta
Liver

ABSTRACT

Aim: To evaluate the sequence of biochemical and pathological changes in liver and abdominal aorta in apolipoprotein-E deficient mice (8 weeks old, standard diet) in relation with age.
Materials and methods: euthanasia (pentobarbital sodium and phenytoin) was practiced at 16, 20 and 30 weeks of age. Glycemia and the level of total cholesterol and its fractions were biochemically routinely determined. Sections of the liver and the ascending aorta were dissected and conventionally processed for morphology and morphometry.
Results: Hyperglycemia was observed at 20 weeks (39%, p<0.02). Hypertriglyceridemia (x2.8,

Autor para correspondencia: **Dr. José Milei.** Instituto de Investigaciones Cardiológicas. (ININCA) UBA - CONICET. Marcelo T. de Alvear 2270 (C1122AAJ). Buenos Aires, Argentina. *e-mail:* ininca@fmed.uba.ar

p<0.01), an increase in non-HDL cholesterol (71%, p<0.05) and a decrease in HDL cholesterol (-26%, p<0.05) were found at 30 weeks. Liver inflammation and portal inflammation increased (4-fold, p<0.01 and 2-fold, p<0.03 respectively) between weeks 20-30. At week 30: aortic plaque area and the percentage of stenosis increased (respectively 5-fold, p<0.0001 and 2.4-fold, p<0.01) and the intima-media ratio increased (3-fold, p<0.05) with media thinning (-69 %, p<0.01). Pre-atherosclerotic lesions consisted of subendothelial clusters of foamy cells in contrast with intimal thickening due to smooth muscle cell proliferation as typically found in man.

Conclusions: ApoE$^{-/-}$ mice spontaneously developed early hyperglycemia, followed by dyslipidemia with hypertriglyceridemia, and hepatic and aortic pathology. The sequence of the changes suggests that hypertriglyceridemia, decreased levels of HDL and hepatic inflammation favored aortic damage progression. Otherwise morphologically similar, the sequence of events resulting in plaque formation is different to that found in man. Bearing this in mind, the ApoE$^{-/-}$ mice model may be used to study the biochemical and molecular events underlying atherosclerosis.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad aterosclerótica está asociada a una variedad de factores etiológicos. Se ha demostrado que los factores genéticos y ambientales, solos o en combinación con otros, desempeñan un papel importante en la etiología de la aterosclerosis[1]. Se ha informado que cuando ciertos animales con predisposición genética a la aterosclerosisson alimentados con dietas ricas en grasas, presentan aceleración de desarrollo de lesiones vasculares inducidas por la dieta[2].

La apolipoproteína E (ApoE) fue descripta por primera vez como un componente de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)[3]. La ApoE es un ligando para el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y juega un papel crucial en la absorción mediada por receptor, de todas las partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), incluyendo VLDL, quilomicrones y sus remanentes[4]. Por lo tanto, la carencia de ApoE ocasiona la acumulación plasmática de los remanentes ricos en colesterol, cuya circulación prolongada es aterogénica[2].La ApoE es sintetizada principalmente en el hígado y los macrófagos. Las evidencias indican que, además de sus efectos en la regulación de las lipoproteínas plasmáticas, también actúa como un modulador inmunológico. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la ApoE podría inhibir la proliferación linfocitaria[5] e interferir el proceso de activación de células Tindirectamente por su influencia en la expresión de IL-2[6]. Estos datos sugieren que las apolipoproteínas E podrían regular la expresión de las citoquinas. Sin embargo, no hay estudios en este sentido a nivel de las citoquinas hepáticas y tampoco con referencia a la relación entre disfunción del metabolismo lipídico y nivel de citoquinas.

Se considera que los ratones genéticamente deficientes en apolipoproteína E (ApoE$^{-/-}$) son un modelo para el estudio de aterosclerosis, ya que el desarrollo de hipertrigliceridemia y la aparición de lesiones arteriales espontáneas reproducen las condiciones propias de la aterosclerosis humana si bien el inicio del proceso aterogénico es totalmente diferente. En nuestro Instituto se realizaron diversos estudios en los que se demostró que la evolución de las lesiones ateroscleróticas en los ratones ApoE$^{-/-}$ podría estar asociada con la progresión hacia una forma inflamatoria grave de daño hepático. Se evidenció una serie de cambios rápidos yt ransitorios alrededor de las 20 semanas de vida, los cuales podrían ser determinantes de la progresión del daño tisular en este modelo transgénico experimental[7]. Asimismo, los ratones ApoE$^{-/-}$ que consumieron bebidas cola endulzadas artificialmente con edulcorantes no nutritivos (cola "light" por su bajo aporte calórico) experimentaron alteraciones no metabólicas independientemente de la expansión de la placa aterosclerótica. Ésto sugeriría que ante la existencia de predisposición genética pro-aterogénica, el consumo de bebidas tipo cola edulcoradas artificialmente podría intensificar las lesiones ateroscleróticas[8]. Por último, se observó que el consumo de bebidas cola, independientemente del contenido de azúcar, aceleró el desarrollo de aterosclerosis en ratones ApoE$^{-/-}$ favoreciendo el crecimiento de la placa aórtica (remodelación interna) sobre el adelgazamiento de la capa media. Los efectos del tratamiento con bebidas cola entre las semanas 8 y 16 del estudio no revirtieron aún mucho tiempo después de la interrupción del consumo de las mismas (semana 30 del estudio). Los datos sugieren que el consumo sostenido de bebidas cola durante las etapas tempranas de la vida puede acelerar el agravamiento del daño aterosclerótico en la adultez, en un escenario genéticamente favorable, tal como ocurre en el caso de los ratones ApoE$^{-/-}$ propensos al desarrollo de aterosclerosis[9].

El objetivo de este trabajo es identificar, describir y cuantificar nuestros hallazgos a nivel bioquímico y en aterosclerosis coronaria resultantes del consumo precoz de bebidas cola en una colonia de ratones ApoE$^{-/-}$. La información procedente representa un aporte y estímulo para el fomento de nuevas investigaciones que continúen indagando en un tema tan actual y acuciante a nivel global como la aterosclerosis con datos locales.

MÉTODOS

Declaración Ética. El experimento fue aprobado por el Comité de cuidados de animales de la Facultad de Medicina de la UBA (CICUAL) y se realizó según la guía de investigación de animales ARRIVE[10].

Un lote de cuarenta y dos ratones transgénicos con deficiencia de apolipoproteína E (ApoE$^{-/-}$) (C57BL/6J, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) se alimentaron *ad libitum*con comida comercial estándar para roedores (16%-18% de proteínas, 0.2 g% de sodio, Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua. Los animales fueron alojados en un bioterio a temperatura ambiente controlada y con ciclos de luz/oscuridad de 12hs. El consumo de alimentos sólidos y líquidos fue medido 2 veces por semana y el peso corporal se determinó semanalmente.

Del total de los animales ingresados sólo 30 ratones completaron el estudio, ya que 12 de ellos murieron repentinamente. Se distribuyeron en forma aleatoria grupos de 10 ratones, y posteriormente fueron sacrificados a las 16, 20 y 30 semanas de vida. Cabe mencionar que este tipo de ratones presenta múltiples alteraciones que disminuyen su viabilidad, siendo esperable la frecuencia de decesos observada en nuestro estudio.

Se practicó eutanasia de los animales bajo anestesia con difenilhidantoína y pentobarbital sódicos (Euthanyl®). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción ventricular. Se utilizaron kits comerciales de uso rutinario en el laboratorio experimental. En alícuotas de plasma se llevó a cabo la determinación de la concentración de: glucosa mediante enzimo-colorimetría (Sigma Chemical Co., St.Louis,MO, kit #315-100) seguida de espectrofotometría, colesterol total (CT) y sus fracciones de alta densidad (HDL) y baja densidad (no-HDL) por reacción enzimática (Sigma Chemical Co., St.Louis,MO, kit #402-20) y triglicéridos(Sigma ChemicalCo., St. Louis,MO, kit #344-20). Las lipoproteínas se separaron por ultracentrifugación (intervalo de densidad: para HDL1.063 a 1.210g/ml,HDL>1.63 g/ml) utilizando un rotor TLA-100(Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

Se desecaron secciones de hígado, riñones, corazón y aorta ascendente. Las muestras se fijaron en formaldehído al 10% (pH=7.0) a temperatura ambiente durante 24hs como mínimo. Luego de la deshidratación (secuencia de etanol al 50%, 70% y100% en agua), los tejidos se incluyeron en bloques de parafina. Se obtuvieron 6 secciones aórticas transversales consecutivas (4µm) a nivel de las valvas de la válvula aórtica a lo largo del seno aórtico, las cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina, colorante tricrómico de Heidenhain (Azan) y orceína para la identificación de fibras elásticas.

Cada una delas 6 secciones transversales se analizó usando un programa acoplado a un microscopio NikonEclipseE400 (programa Image ProPlus para Windows, v3). Se cuantificaron el área de placa y los espesores de las capas íntima y media. Se calculó la relación entre el área de placa y la capa media (relación placa/media) para estimar el grado de remodelación arterial[11]. Se procesaron secciones de hígado de 4 µm para microscopía y se determinó el grado de inflamación del parénquima de acuerdo con la escala de esteatohepatitis no alcohólica (non alcoholic steato hepatitis, NASH)[12], cuya puntuación va del 0 al 4 e incluye: esteatosis, inflamación del parénquima, daño hepatocelular, inflamación portal y fibrosis.

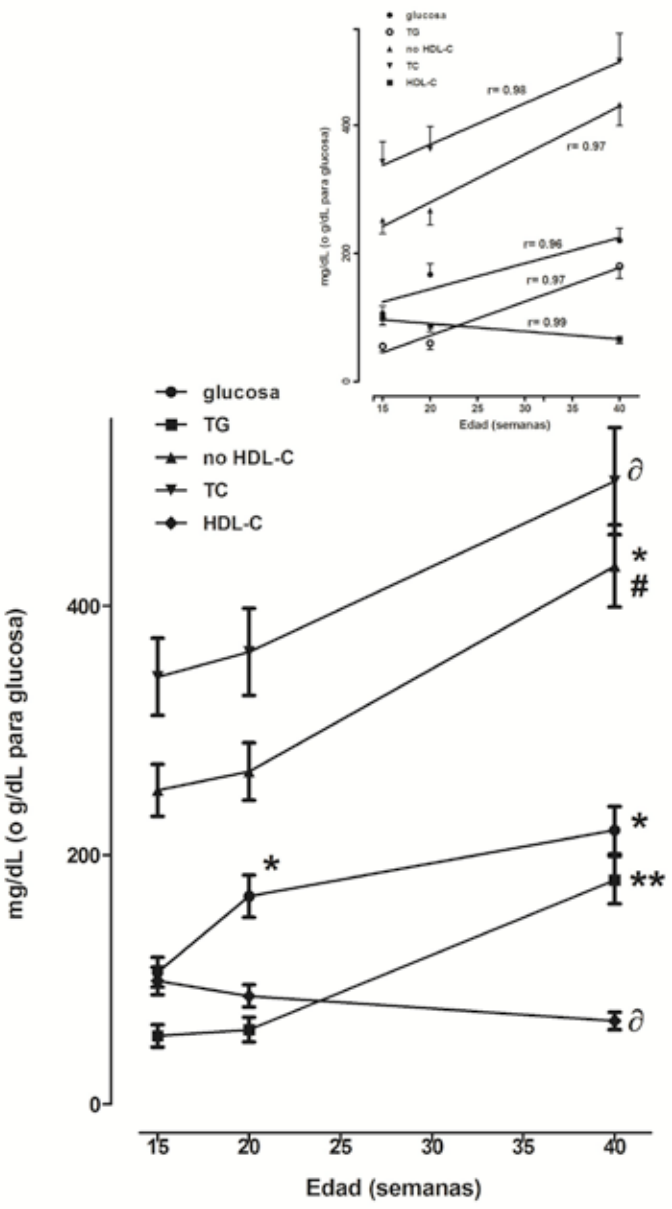


FIGURA 1

Bioquímica sanguínea en función de la edad de los animales.

Los resultados se expresan como valor promedio ± ES. *p<0.02 vs 16 semanas; ** p<0.01 vs 16 ó 20 semanas; # p<0.05 vs 20 semanas; ∂ p<0.05 vs 16 semanas.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos al análisis multivariado de la varianza (MANOVA) basado en un diseño factorial (programa SPSS™ versión 17.0). Ésto permitió identificarlas principales fuentes posibles de variación de los valores, i.e.: el tratamiento y la edad. Finalmente, la prueba de Dunnett permitió evaluar las diferencias entre grupos experimentales a distintos tiempos durante el curso del estudio. Se

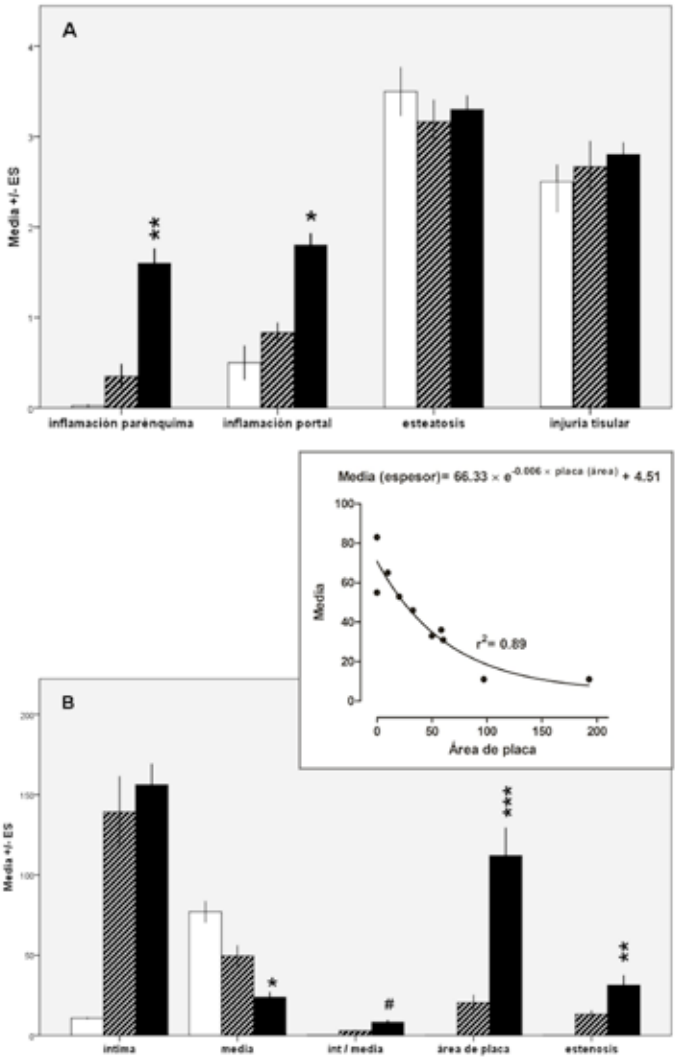


FIGURA 2.
Patología hepática (A) y aórtica (B) en función de la edad de los animales.
Columnas: blanco (16 semanas), rayado diagonal (20 semanas), negro (30 semanas). Los resultados se expresan como valor promedio ± ES; (A) *p<0.03, ** p<0.01 vs 16 ó 20 semanas; (B) # p<0.05 vs 16 semanas,* p<0.01 vs 16 ó 20 semanas, ** p<0.01 vs 16 semanas, ***p<0.0001 vs 16 ó 20 semanas.

confirmó la existencia de cambios significativos cuando la probabilidad de obtener un resultado falso positivo fue menor al 5% y se adoptó convencionalmente una p<0.05 (error de tipo I, falso positivo: aceptar la hipótesis alternativa cuando la hipótesis nula es verdadera).

RESULTADOS

El peso corporal y la ingesta nutricional de los ratones ApoE$^{-/-}$ no se modificaron a lo largo del estudio (**Tabla1**). Los decesos observados a distintos tiempos (12 animales de un total de 42 animales ingresados al inicio) serían atribuibles a las lesiones ateroscleróticas coronarias avanzadas como las descriptas en los exámenes histológicos. En efecto, los animales muertos mostraron lesiones de gravedad.

TABLA 1.
Peso corporal de los ratones ApoE$^{-/-}$ y consumo diario de líquido y sólido.

Edad (semanas)	16	20	30
Peso corporal (g)	26,40 ± 3,01	26,73 ± 3,41	26,31 ± 3,63
Ingesta sólida (g)	3,08 ±0.23	3,56 ±0.33	3,52 ±0.22
Ingesta líquida (mL)	4,71 ± 1,13	4,75 ± 1,09	4,74 ± 1,95
Ingesta sólida/ peso corporal (g/g)	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Ingesta líquida/ peso corporal (mL/g)	0,18 ± 0,06	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,01

Los resultados están expresados como valor promedio ± ES de 10 animales por grupo.

Bioquímica Sanguínea

El tiempo de vida fue un factor de variación en los niveles plasmáticos de glucosa ($F_{2,20}$= 3.55, p<0.05), triglicéridos (TG) ($F_{2,20}$= 4.86, p<0.02), no-HDL ($F_{2,20}$= 3.75, p<0.04), colesterol total (CT) ($F_{2,20}$= 3.52, p<0.05) y la fracción HDL ($F_{2,20}$= 3.61, p<0.05). La glucemia aumentó a las 20 semanas (39%, p<0.02 vs16 semanas) seguida por un aumento en el nivel de TG (2.8 veces vs 16 semanas ó 20 semanas, p<0.01), la fracción no-HDL (71% vs 16 semanas, p<0.02; 62% vs 20 semanas, p<0.05) y CT (46% vs 16 semanas, p<0.05) y una disminución en la fracción HDL (-26% vs 16 semanas, p<0.05) a las 30 semanas (**Figura 1**).

Patología hepática y aórtica

La edad de los animales fue un factor de variación determinante en la inflamación del parénquima hepático ($F_{2, 20}$ = 8.38, p <0.002), el grado de inflamación portal ($F_{2, 20}$ = 6.42, p <0.007), el espesor de la capa íntima ($F_{2, 20}$= 3.51, p <0.05), el espesor de la capa media ($F_{2, 20}$ = 6.90, p <0.005), la relación íntima/media ($F_{2, 20}$ = 6.18, p<0.008), el área de la placa aórtica ($F_{2, 20}$ = 8,68, p <0.002) y el porcentaje de estenosis ($F_{2, 20}$ = 4.69, p <0.02).

La inflamación del parénquima hepático aumentó 4 veces (p<0.01) y el grado de inflamación portal se duplicó (p <0.03) entre las 20 y 30 semanas (**Figura 2A**). A las 30 semanas: el área de la placa aórtica se quintuplicó (p<0.0001), el porcentaje de estenosis aumentó 2.4 veces (p<0.01), la relación de la íntima-media se triplicó (p<0.05) y el espesor de la capa media se redujo (-50% vs 20 semanas, p<0.01;-69% vs 16 semanas, p<0.01) (**Figura 2B**).

El espesor de la capa media de la aorta disminuyó exponencialmente con el aumento del área de placa (81% de la varianza explicada, p<0.001) (**Figura 2B superior**).

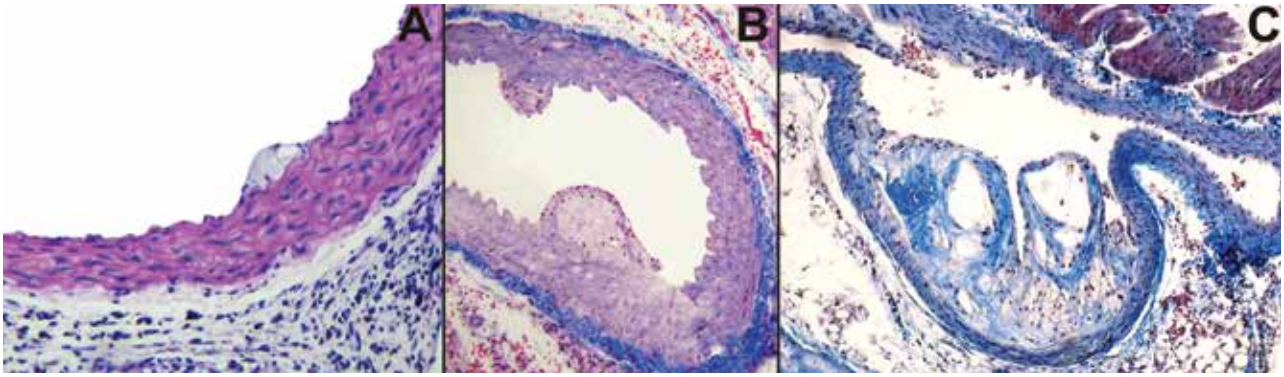


FIGURA 3.
Desarrollo y evolución de alteraciones morfológicas durante el estudio.
Figura 3A (semana 16): pequeños focos de macrófagos espumosos agrupados.
Figura 3B (semana 20): mayor cantidad de focos de macrófagos espumosos agrupados cubiertos por una capa fibrosa delgada con reducción parcial del calibre aórtico y lámina elástica interna estructuralmente conservada.
Figura 3C (semana 30): xantomas necróticos extensos acelulares representados por nódulos fibrolipídicos fragmentando las láminas elásticas interna y externa que presentan discontinuidades.

Descripción de las alteraciones morfológicas.
Se observaron pequeños grupos focales de macrófagos espumosos durante la semana 16 (**Figura 3A**), siendo más numerosos a las 20 semanas, momento en el cual se encontraban cubiertos por una capa fibrosa delgada que ocluía parcialmente la luz aórtica. Se observó indemnidad de la lámina elástica interna (**Figura 3B**). En la semana 30 se observaron extensos xantomas necróticos acelulares representados por nódulos fibrolipídicos, los cuales fragmentaban a las láminas elásticas interna y externa las que se mostraban discontinuas (**Figura 3C**).

DISCUSIÓN

De acuerdo con lo esperado en base a la bibliografía existente para este modelo transgénico, los ratones ApoE$^{-/-}$ desarrollaron extensas lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Lo destacable y característico de este modelo es que las lesiones se observaron en los ratones jóvenes a nivel de seno aórtico y su distribución y tamaño fueron aumentando en función de la edad. Los macrófagos (Mo) participaron desde el inicio en el proceso patológico a nivel de la capa íntima y no se detectó actividad proliferativa de los miocitos. Nuestros resultados concuerdan con lo sugerido por otros autores con referencia a que el aumento en la población de macrófagos en la placa aterosclerótica de los ratones ApoE$^{-/-}$ actuaría favoreciendo la disfunción endotelial descripta en este modelo[12, 13, 14].
No se observó fluctuación en el peso corporal de los ratones ApoE$^{-/-}$ a lo largo del período de estudio. En el curso del mismo, la frecuencia de muerte fue de 29%, análogamente a lo descripto en la literatura[15].
La disfunción endotelial se ha observado en diferentes lechos vasculares en ratones ApoE$^{-/-}$[16] y se sabe que las dietas con alto contenido de hidratos de carbono causan deterioro de la función endotelial en este modelo.
La hiperglucemia está asociada al aumento del riesgo de enfermedad aterosclerótica si bien la inversa no está confirmada, i.e.: que la aterosclerosis predisponga al desarrollo de hiperglucemia[17]. En este estudio se observó que la glucemia plasmática aumentó a partir de la semana 20 en los ratones ApoE$^{-/-}$ susceptibles a la aterosclerosis que fueron alimentados con comida estándar (i.e.: con contenido graso y glúcido normal). Un trabajo reciente demostró que estos ratones desarrollaron hiperglucemia comparados con los ratones ApoE$^{-/-}$ BALB (cepa contraparte murina resistente a la aterosclerosis) si bien ambos tipos de ratones fueron alimentados con comida estándar. Ésto se debió a la ausencia de la segunda fase de secreción de insulina y la disminución de la masa celular beta encontrada en los ratones ApoE$^{-/-}$[17]. Nuestros hallazgos sugerirían que la predisposición genética a la aterosclerosis favorecería a su vez el desarrollo de hiperglucemia. Un estudio informó por el contrario, una disminución inexplicable en la glucemia en ratones ApoE$^{-/-}$[15] sin hallarse asociación directa entre la hiperglucemia y el daño aórtico. Sin embargo, otros autores demostraron que los ratones ApoE$^{-/-}$ desarrollan hiperglucemias relacionadas con daño carotídeo[18].
La hipertrigliceridemia secundaria a hiperglucemia es resultado de la esteatosis hepática[19]. Una interacción compleja de interrelaciones celulares mediadas por factores quimiotácticos, citoquinas proinflamatorias y moléculas reguladoras del crecimiento, participan tanto en la aterogénesis como en la inflamación del hígado[20, 21]. El conocimiento del curso temporal de los mediadores químicos de la inflamación relacionados con la aterosclerosis podría ayudar a identificar a los candidatos principales responsables de la evolución de la aterosclerosis en este modelo experimental.
La remodelación patológica de la pared aórtica resultó en adelgazamiento exponencial de la capa media en respuesta al crecimiento de la placa.

Los cambios histopatológicos asociados con alteraciones metabólicas se expresaron entre las 20 y 30 semanas del estudio. Los cambios producidos en este intervalo de tiempo serían cruciales para determinar la progresión del daño tisular en este modelo de aterosclerosis. Es importante enfatizar que la *secuencia de formación* de las lesiones ateroscleróticas es diferente a la observada en el ser humano. Los ratones ApoE$^{-/-}$ desarrollan aglomeraciones subendoteliales de macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) mientras que en el ser humano los engrosamientos intimales pre-ateroscleróticos resultan de la proliferación inicial de células musculares lisas y posteriormente aparecen los macrófagos cargados de lípidos[7, 8, 9] que luego conducen a la formación de la placa. Teniendo en cuenta estas diferencias, el modelo experimental de ratones ApoE$^{-/-}$ resulta útil para estudiar mecanismos bioquímicos y moleculares en la placa constituida.

CONCLUSIONES

Los ratones ApoE$^{-/-}$ jóvenes alimentados con una dieta de composición normal en cuanto a contenido calórico, lipídico y de carbohidratos, desarrollaron espontáneamente hiperglucemia temprana y sostenida, seguida de dislipidemia con predomino de hipertrigliceridemia, y patología hepática y aórtica. La cinética de los cambios sugiere que la hipertrigliceridemia contribuyó indirectamente a la progresión del daño aórtico, favorecido a su vez por el descenso en los niveles de HDL, probablemente a través de mediadores liberados en relación con la inflamación hepática. La inflamación del hígado se relacionó con la expansión de la placa aórtica como resultado del proceso de envejecimiento.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Florencio Fiorini y al Instituto de Investigaciones Cardiológicas. Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. ININCA. UBA. CONICET por la financiación de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Milei J, Rodríguez-Granillo GA. Ateroesclerosis. Anatomía patológica y diferencias topográficas. En TC y RM Cardiovascular. Rodríguez-Granillo GA, Gómez E, Bastarrika G, Cademartiri F. Ediciones Journal S.A. 2014. Buenos Aires, Argentina. www.edicionesjournal.com
2. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking ApoE. Arterioscler Thromb **1994**; 14: 141-7.
3. Shore VG, Shore B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. Biochemistry **1973**; 12: 502-7.
4. Mahley RW, Ji, ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein. E J Lipid Res **1999**; 40: 1-16.
5. Pepe MG, Curtiss LK. Apolipoprotein E is a biologically active constituent of the normal immunoregulatory lipoprotein, LDL-In. J Immunol **1986**; 136: 3716-23.
6. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, et al. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. Cell Immunol **1994**; 159: 124-39.
7. Otero-Losada M, Mc Loughlin S, Rodríguez-Granillo GA, et al. Chronological changes of aortic and hepatic lesions in apolipoprotein E deficient mice. Artery Research **2011**; 5: 109-11.
8. Otero-Losada M, Mc Loughlin S, Rodríguez-Granillo GA, et al. Metabolic disturbances and worsening of atherosclerotic lesions in ApoE$^{-/-}$ mice after cola beverages drinking. Cardiovasc Diabetol **2013**; 12: 57. doi: 10.1186/1475-2840-12-57.
9. Serafini EM, Otero-Losada M, Cao G, et al. Las bebidas cola aceleran el crecimiento de la placa aterosclerótica en ratones ApoE$^{-/-}$. Rev Argent Cardiol **2014**; 82: 133-8.
10. lkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol **2010**; 8 (6): e1000412
11. Weatheall D. A working group report chaired by Sir David Weatheall FRS FMedSci. The use of non-human primates in research. December **2006**; 147 pp. www.acmedsci.ac.uk/download.php?f=file&i=17171
12. Collier J. Non-alcoholic fatty liver disease. Medicine **2006**; 35: 86-8.
13. Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, et al. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. Lipids Health Dis **2011**; 10: 211. doi: 10.1186/1476-511X-10-211.
14. Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, et al. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol **2010**; 30: 1606-13.
15. Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, et al. Pathophysiology of Apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to Apo E-related disorders in humans. FASEB J **2001**; 15: 2623-30.
16. Gaspari T, Liu H, Welungoda I, et al. A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE$^{-/-}$ mouse model. DiabVasc Dis Res **2011**; 8: 117-24.
17. Li j, Wang Q, Chai W, et al. Hyperglycemia in Apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. Cardiovasc Diabetol **2011**; 10: 117. doi: 10.1186/1475-2840-10-117.
18. Tous M, Ribas V, Escolà-Gil JC, et al. Manipulation of inflammation modulates hyperlipidemia in Apolipoprotein E-deficient mice: a possible role for interleukin-6. Cytokine **2006**; 34: 224-32.
19. Moon YA, Liang G, Xie X, et al. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. Cell Metab **2012**; 15: 240-6.
20. Mach F. The role of chemokines in atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. **2001**; 3: 243-51.
21. Otero-Losada M, Cao G, Mc Loughlin S, Rodríguez-Granillo G, Ottaviano G, Milei J. Rate of Atherosclerosis Progression in ApoE$^{-/-}$ Mice Long After Discontinuation of Cola Beverage Drinking. PLoS One **2014**; 9 (3): e89838.