

## Un modelo animal para el estudio de la arteriosclerosis experimental

### An animal model for the research of the experimental atherosclerosis

L. M. Salmerón Febres - V. García Róspide - J. Moreno Escobar - M. Rodríguez Piñero - J. Jiménez Ruano - J. Martínez Gámez - C. López Espada - J. Linares Palomino - R. Peñafiel Marfil - E. Ros Die

**Servicio de Angiología y Cirugía Vascular  
(Jefe de Servicio: Prof. Dr. E. Ros Die)  
Hospital Clínico Universitario  
Granada (España)**

#### RESUMEN

**Objetivo:** Establecer un modelo animal de arteriosclerosis experimental.

**Material y métodos:** Escogimos como animal de experimentación el conejo albino New Zealand y seleccionamos un total de 76 conejos distribuidos en tres grupos:

- El arteriosclerótico formado por 30 conejos (15 machos y 15 hembras).
- El control constituido por otros 30 conejos homogéneos en edad y peso al anterior (15 machos y 15 hembras).
- El grupo gazapo, este último formado por 16 ejemplares y con una edad media de tan solo 40 días (8 machos y 8 hembras).

El grupo control y el de los gazapos fueron alimentados con pienso estándar, durante 60 y 7 días, respectivamente, y al arteriosclerótico se le suplementó la dieta con un 2 % de colesterol disuelto en 14 cc. de aceite de girasol.

**Resultados:** Al final de este período los animales del grupo A desarrollaron una arteriosclerosis, lo que se comprobó al presentar sus lipoproteínas séricas un perfil característico, así como los datos obtenidos del estudio anatopatológico de la aorta torácica y abdominal.

**Conclusiones:** Con este trabajo creemos haber demostrado que el conejo albino New Zealand es un animal adecuado como modelo de arteriosclerosis experimental. En la arteriosclerosis inducida por sobrecarga dietética de colesterol apare-

ce una lipoproteína anómala con movilidad electroforética prebeta, pero transportadora de colesterol principalmente y que se asocia a un aumento en plasma de la apoproteína E, la cual juega un papel muy importante en la génesis de la arteriosclerosis.

**Palabras clave:** Arteriosclerosis experimental; lipoproteínas; dieta aterógena; conejo New Zealand.

#### SUMMARY

**Objective:** To establish an animal model for the study of atherosclerosis.

**Methods:** We choose New Zealand White rabbits and selected 76 animals distributed in three groups:

- The atherosclerotic group consisted of 30 rabbits (15 males and 15 females).
- The control group consisted of 30 animals of similar aged and weight (15 males and 15 females).
- The baby rabbit group consisted of 16 animals, average age of 7 days (8 males and 8 females).

The control group and the baby rabbit groups were fed a standard diet for 60 days and 7 days respectively, and the atherosclerotic group was fed the same diet modified by adding a 2 % cholesterol solution to 14 cc. of sunflower oil.

**Results:** At the end of the 60 days, the animal of group A, developed atherosclerosis as shown by determination of serum lipoprotein levels as well as by pathological examination of the thoracic and abdominal aorta.

**Conclusions:** Our results show the New Zealand White rabbit is a suitable animal for experimental model of atherosclerosis. An abnormal lipoprotein with prebeta electroforetic mobility, that transports cholesterol, is present in animals

*with atherosclerotic lesions induced by cholesterol rich diets. This anomalous lipoprotein is associated with an increase of apoprotein E in the blood, which plays a significant role in the genesis of atherosclerosis.*

**Key words:** Experimental atherosclerosis; lipoproteins; atherogenic diet; New Zealand rabbit.

## Introducción

La Arteriosclerosis es una enfermedad cuya génesis no está completamente aclarada a pesar de las diversas teorías sobre su etiopatogenia. Lo cierto es que aún no hay estudios que nos permitan elaborar una hipótesis que de respuesta a todos los interrogantes planteados y permita la aplicación de un tratamiento eficaz a esta enfermedad, responsable directa e indirecta del fallecimiento del 75 % de individuos mayores de 50 años.

Por otra parte, las investigaciones realizadas en pacientes tropiezan con importantes dificultades, como son el difícil control en el tiempo, ya que son lesiones que van evolucionando paulatinamente con el paso de los años, así como la imposibilidad de cuantificar y analizar las lesiones antemorten. De aquí la importancia de poder contar con un modelo animal de experimentación adecuado y reproducible.

El conejo, y más concretamente el albino en su variedad New Zealand, fue el primer modelo animal de arteriosclerosis utilizado y se continúa empleando para tal fin (1, 2, 3). Ultimamente algunos investigadores han puesto objeciones al conejo como animal idóneo, al ser herbívoro y tener un metabolismo del colesterol diferente al del ser humano, sin embargo, la similitud de los perfiles lipoproteicos séricos, así como de las lesiones anatopatológicas vasculares encontradas en el conejo y en el humano, nos hacen pensar que este tipo de conejo es un animal adecuado como modelo de arteriosclerosis experimental (4, 5, 6).

## Material y métodos

Se eligió como animal de experimentación, el **conejo albino New Zealand** (7, 8, 9, 10). Fueron seleccionados 30 ejemplares que constituyeron el **grupo prueba o arteriosclerótico**, 15 machos y 15 hembras, proporcionados por un criadero especializado, con una edad media

de once meses y con un peso medio de 3.112,53 g. para los machos y de 3.382,00 g. para las hembras (los pesos de los animales eran homogéneos). Los animales fueron ubicados en las dependencias del Centro de cría y control de animales de experimentación de la Universidad de Granada (Fig. 1).

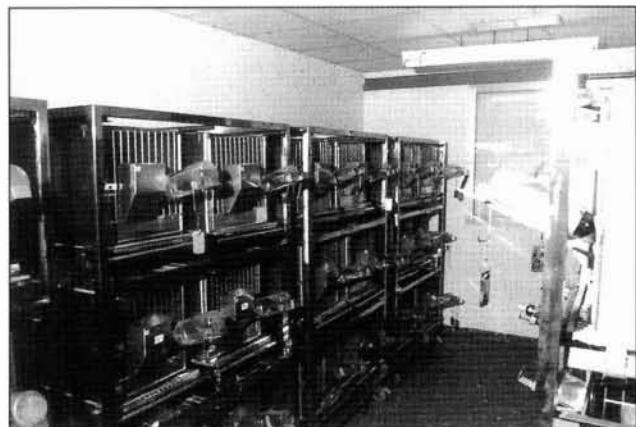


Fig. 1.: Animalario de la Universidad de Granada.

A su llegada, fueron mantenidos durante una semana en régimen de cuarentena en jaulas individuales; y al finalizar este período y observar el buen estado de salud y el normal comportamiento de todos ellos, fueron ubicados en su sala definitiva, en jaulas individuales, a una temperatura constante entre 20° y 25°C, y sometidos a un ritmo circadiano de 10 horas de luz y 14 de oscuridad. Cada una de las jaulas contaba con comedero y bebedero independiente, siendo este último un recipiente calibrado del que el animal succionaba el agua, a fin de mejorar la higiene de la jaula y controlar la ingesta de la misma.

Los 30 conejos fueron alimentados desde su llegada al laboratorio y durante dos semanas (una semana en el área de cuarentena y otra semana en su recinto definitivo) con pienso estándar, cuya composición se determina en la Tabla I. Se les alimentaba «ad libitum», controlando la cantidad que diariamente ingería cada uno y, al finalizar las dos semanas, se calculó la media de la ingesta de los machos y la de las hembras y diariamente se proporcionó dicha cantidad media, que fue de 175 g para los machos y 189 g para las hembras, a fin de que todos comieran igual cantidad de pienso.

El agua se suministró «ad libitum». Al finalizar estos primeros catorce días, a los 175 g de pienso estándar (189 g para las hembras) se les añadió un 2 % de coles-

Composición del pienso estándar suministrado				
FORMULA %	ANALISIS MEDIO	AMINOACID. (mg/kg)	MINERALES (mg/Kg)	VITAMINAS (mg/Kg)
Cereales 42,8	Calorías 2.200	Arginina 6.800	P 4.100 N 3.500 C	A* 2,8 N 6,5 C
Salvados 49	Humedad 10 %	Cistina 2.100	Cu 12 N 15 C	B <sub>1</sub> 4,3 N 0,0 C
Complem. Vit-Min. 4,2	Glúcidos (ENL) 49,3	Metionina 1.600	K 0,0 N 10.600 C	B <sub>2</sub> 3,8 N 0,0 C
Proteína vegetal 4,2	Celulosa (Weende) 17	Lisina 4.600	Ca 4.500 N 4.600 C	B <sub>3</sub> 16 N 0,0 C
	Prótidos 13	Triptófano 1.400	Na 1.150 N 1.950 C	B <sub>6</sub> 1 N 1 C
	Mineral 8	Glicina 5.200	Mg 0,0 C 2.100 N	D <sub>3</sub> * 30 N 1.000 C
			Mn 40 N 130 C	E 16 N 10 C
			Fe 160 N 40 C	K <sub>3</sub> 6 N 1 C

N: Cantidad natural  
C: Cantidad complementada  
\*: Medidas en Unidades Internacionales (U/I)

Tabla I

terina disuelta en 14 cc de aceite de girasol, haciendo una mezcla homogénea con todo ello. La dosis de cada conejo era preparada individual y diariamente. Así fueron alimentados todos los animales, machos y hembras, durante un período de 60 días más.

A todos los animales se les determinaron en sangre valores de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas. Las determinaciones se hicieron al principio de la experiencia y una vez iniciada la alimentación aterogénica, cada 15 días. Igualmente cada quince días se les pesaba. La sangre se extraía canalizando la arteria dorsal de la oreja con una aguja intravenosa (21G1 0,8x25) y dejando fluir la sangre libremente a un tubo de ensayo.

El **grupo control** lo constituyan otros 30 conejos, 15 machos y 15 hembras, con un peso medio de 3.812,27 g para los machos y 2.947,87 g para las hembras y que recibieron el mismo tratamiento que los anteriores en cuanto a hábitat, temperatura, ritmo circadiano, control de la cantidad de alimento, de peso y de los valores en sangre antes citados, solo que durante los sesen-

ta días fueron alimentados únicamente con pienso estándar.

El mismo tratamiento que el grupo control recibieron otros 16 conejos (8 machos y 8 hembras), de 40 días de edad media y con un peso medio de 1.889,50 g para los machos y 1.951 g para las hembras. Estos conejos constituyeron el **grupo de los gazapos**.

Al final de los 60 días, los animales del grupo prueba y control fueron sacrificados con una dosis letal de pentotal intraperitoneal. Los animales del grupo gazapos fueron sacrificados después de la semana de cuarentena de la misma forma. A todos los animales se les realizó una necropsia y mediante técnica quirúrgica reglada se les extirpó el arco aórtico, la aorta torácica y la aorta abdominal hasta la bifurcación de las arterias ilíacas, a fin de obtener las muestras necesarias para realizar el estudio anatomo-patológico. (Fig. 2).

En dicho estudio se empleó la microscopía óptica usando las técnicas de la Hematoxilina-Eosina, el Tricrómico de Mason y la de Unna con orceína-picrocarmin de índigo.

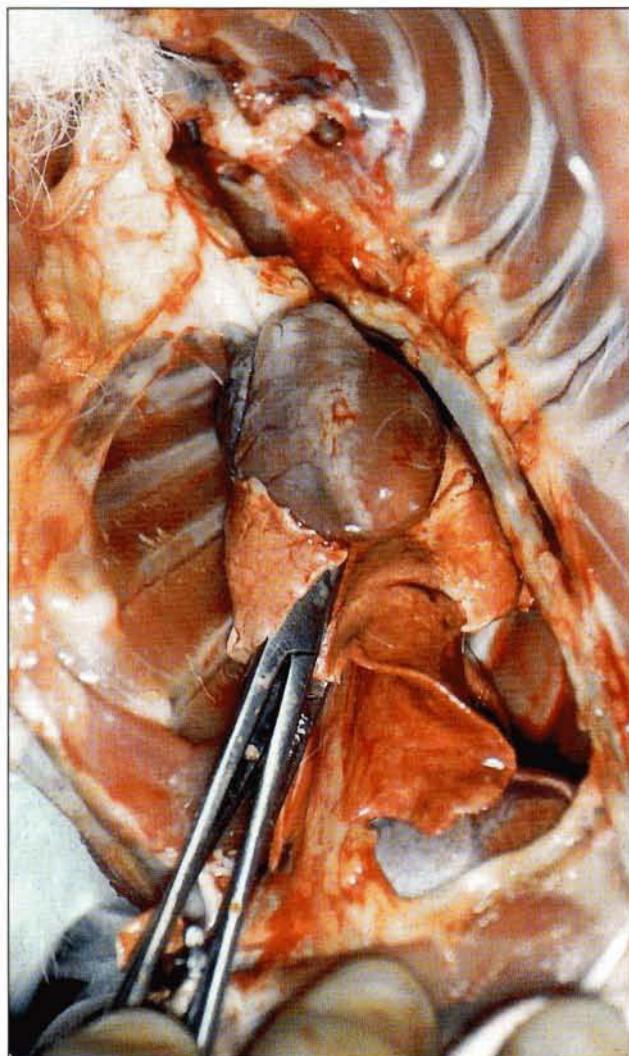


Fig. 2.: Toracotomía para exponer la aorta torácica descendente.

## Resultados

### Estudio de las lipoproteínas en el suero

En el grupo control el perfil electroforético de las lipoproteínas no se modificó en ninguno de los controles que se realizaron cada 15 días, mientras que en el grupo arteriosclerótico, se produce ya a los 15 días una brusca elevación de los niveles séricos de colesterol, que continúa aumentando para estabilizarse a los 45 días (Tabla II).

De la misma forma el patrón electroforético de las lipoproteínas se modificó a lo largo de la experiencia y, así, al comparar dichos patrones en basal y a los dos

meses en el grupo arteriosclerótico, vemos que se produce una drástica disminución de las cifras de todas las lipoproteínas, pasando la prebeta de un 23,44 % a un 0 %, la beta de un 36,96 % a un 9,63 % y la alfa de un 48,51 % a un 0 %, apareciendo de forma predominante en la banda electroforética (85,44 %) una lipoproteína con movilidad prebeta pero que transporta principalmente colesterol y que nosotros hemos denominado **PBch**. Dicha lipoproteína no aparece en basal (Tabla III).

### Descripción de las medias de los niveles séricos de lipoproteínas del grupo arteriosclerótico a lo largo de la experiencia

MEDIAS SUERO	BASAL	15 DIAS	30 DIAS	45 DIAS	60 DIAS
COLEST.	56,03	1819,20	2340,30	2236,30	2233,10
TRIGLI.	97,13	104,07	110,50	125,11	171,32
QUILO	1,93	6,63	3,51	3,57	3,05
PREBETA	23,44	0,0	0,0	0,0	0,0
PBch	0,0	63,36	70,00	76,86	85,44
BETA	36,96	28,11	25,50	15,13	9,63
ALFA	48,51	2,40	1,47	0,84	0,0

PBch: Lipoproteína con movilidad electroforética prebeta, pero transportadora principalmente de colesterol.

Tabla II

### Comparación de los valores séricos de lipoproteínas del grupo arteriosclerótico en basal y a los dos meses

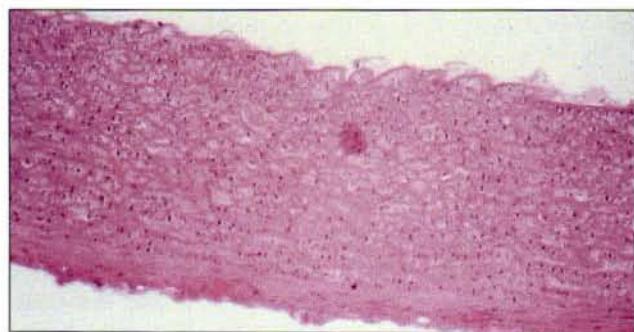
MEDIAS SUERO	G. ARTERIO BASAL	G. ARTERIO A 2 MESES	P	SIGNIFIC.
COLEST.	56,03	2233,10	P<0,001	SI
TRIGLI.	97,13	171,32	P<0,05	SI
QUILO	1,93	3,05	P>0,05	N.S.
PREBETA	23,44	0,0	P<0,001	SI
PBch	0,0	85,44	P<0,001	SI
BETA	36,96	9,63	P<0,001	SI
ALFA	48,51	0,0	P<0,001	SI

PBch: Lipoproteína con movilidad electroforética prebeta, pero transportadora principalmente de colesterol.

Tabla III

### Resultados del estudio anatomopatológico

En el grupo control, al final de los dos meses, no se apreciaron lesiones en las paredes arteriales de los segmentos analizados, al igual que en el de los gazapos, mientras que en el grupo alimentado con suplemento de colesterol se apreciaron signos de una arteriosclerosis típica, como una proliferación de células musculares lisas en la capa media, rotura de la membrana basal de la íntima, fibrosis adventicial y abundantes placas de ateroma en el endotelio. Por tanto, todos los conejos de este último grupo, sin excepción, desarrollaron al final de los dos meses una arteriosclerosis que pudo ser comprobada anatomicamente (Figs. 3 y 4).



**Fig. 3.**: Aorta abdominal de conejo control. Técnica de Hematoxilina-Eosina.



**Fig. 4.**: Aorta abdominal de conejo arteriosclerótico. Se observa placa de ateroma, infiltrado de tejido conectivo en la media y adelgazamiento de ésta. Técnica de tricrómico de Mason.

### Discusión y conclusiones

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el estudio sérico de las lipoproteínas entre los grupos control y el arteriosclerótico en basal, por lo que las dos

muestras se consideraron homogéneas (ya lo eran con respecto al peso) y por tanto perfectamente comparables.

Al final de los 60 días pudimos comprobar, tanto bioquímica como anatomicamente, que los 30 conejos New Zealand a los que se les había alimentado con una dieta suplementada con colesterol, habían desarrollado una arteriosclerosis. Así, los niveles séricos de colesterol se fueron elevando de forma progresiva, estabilizándose a partir de los 30 días. Dicha elevación fue espectacular, pasando las cifras de 55,07 a 2261,10 mg/dl al final de los 60 días, siendo esa diferencia significativa ( $p<0,001$ ), cumpliéndose por lo tanto el objetivo propuesto.

Los triglicéridos experimentaron una elevación más gradual y mantenida, de tal forma que a los 60 días continuaban aumentando, pasando de unos niveles de 101,67 a 166,50 mg/dl, diferencia estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ).

El estudio de las lipoproteínas en suero fue interesante, ya que se produjo una alteración considerable del patrón electroforético en el grupo arteriosclerótico al final de los 60 días de dieta aterogénica (11, 12, 13).

Como puede verse en la Tabla III, se produce una desaparición de las lipoproteínas prebeta (VLDL) y alfa (HDL), transportadoras, respectivamente, de triglicéridos y fosfolípidos. Esta desaparición tiene lugar a expensas del aumento espectacular de una lipoproteína denominada en la tabla anterior **PBch** y que presenta una movilidad electroforética semejante a la prebeta; pero, sin embargo, transporta principalmente colesterol en lugar de triglicéridos, como sería lo habitual.

Este hallazgo ha sido mencionado por otros autores como *Getz* y cols. (14), quienes en la arteriosclerosis experimental por sobrecarga dietética de colesterol encuentran, también, esta lipoproteína asociada a un aumento en plasma de **ipoproteína E**, que denominan **VLDL<sub>s</sub>**.

El papel de la **ipoproteína E** en la aterogénesis es complejo y actualmente está sometido a estudio. Parece que interviene tanto en la distribución centrífuga del colesterol hacia las células periféricas y macrófagos (arteriosclerosis), como en la distribución centrípeta de éste hacia el hígado. El rol aterogénico o antiaterogénico de la **ipoproteína E** depende de varios factores, especialmente de la lipoproteína con la que se asocie, una asociación que puede reflejar el flujo centrífugo (arteriosclerosis) o centrípeto del colesterol (14, 15).

El haber encontrado un aumento considerable de la lipoproteína **VLDL<sub>s</sub>** en el patrón electroforético de los conejos del grupo arteriosclerótico, viene a reforzar y confirmar las teorías anteriormente expuestas acerca del papel de la **apoproteína E** en la génesis de la arteriosclerosis.

Por tanto, podemos concluir diciendo que el conejo albino New Zealand constituye un animal adecuado para el desarrollo de un modelo de arteriosclerosis experimental que puede lograrse mediante un suplemento de colesterol en su dieta habitual.

## BIBLIOGRAFIA

1. IGNATOWSKI, A. I.: Influence of animal food on the organism of rabbits. *S. Perterb. izv. Voyenno-Med. Akad.*, 1908; 16:154-176.
2. ANITSCHKOW, N.: Über die Atherosklerose der Aorta beim Kaninchen und über deren Entstehungsbedingungen. *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.*, 1914; 59:308-348.
3. BADIMON, J. J.; BADIMON, L.; AND FUSTER, V.: Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J. Clin. Invest.*, 1990; 85:1234-1241.
4. CHEN, F. M.; LEE, Y. T.; HSU, H. C. et al.: Effects of dietary supplementation with fish oil on atherosclerosis and myocardial injury during acute coronary occlusion-reperfusion in diet induced hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Cardiol.*, 1992; 35 (3):323-331.
5. ZHU, B. Q.; SIEVERT, R. E.; SUN, Y. P.; ISENBERG, W. M.; AND PARMLEY, W. W.: Effect of lovastatin on suppression and regression of atherosclerosis in lipid-fed rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1992; 19 (2):246-255.
6. SPAGNOLI, L. G.; ORLANDI, A.; MAURIELLO, A. et al.: Aging and atherosclerosis in the rabbit. Distribution, prevalence and morphology of atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1991; 89:11-24.
7. CLARKSON, T. B. et al.: Biology of the laboratory rabbit. London. Edit. Academic Press Inc., 1974; 6: 155-174.
8. HANSSON, G. K.; SEIFERT, P. S.; OLSON, G. and BONDJERS, G.: Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesion of cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis Thromb.*, 1991; 11:745-750.
9. HOOVER, R. L.; ROSENBERG, R. D. and HAERING, W.: Inhibition of rat arterial smooth muscle cell proliferation by heparin: II. In vitro studies. *Circ. Res.*, 1980; 47:578-83.
10. VERVEUREN, T. J.; JORDAENS, F. H.; ZONNEKEYN, L. L.; VAN HOVE, C. E.; COENE, M. C. and HERMAN A. G.: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ. Res.*, 1986; 58:552-64.
11. KHOO, J. C.; MILLER, E.; MCLOUGHLIN, P. and STEINBERG, D.: Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I. *J. Lipid. Res.*, 1990; 31:645-652.
12. KIM, J. A.; MAXWELL, K.; HAJJAR, D. P. and BERLINER, J. A.: VLDL incises endothelial cell plasma membrane cholesterol. *J. Lipid Res.*, 1991, 32:1125-1131.
13. NORDESTGAARD, B. G.; TYBJAERG-HANSEN, A. and LEWIS, B.: Influx in vivo of low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentration, extent of aortic lesion, and lipoprotein particle size as determinants. *Arteriosclerosis Thromb.*, 1992; 12:6-18.
14. GETZ, G.; MAZZONE, T.; SOLTYS, P. and BATES, S.: Atherosclerosis and apoprotein E an enigmatic relationship. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1988; 112:1048-47.
15. ROSENFELD, M. E.; PALINSKI, W.; YLA-HERITUALA, S.; BUTLER, S. and WITZTUM, J. L.: Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity in WHHL rabbits. *Arteriosclerosis*, 1990; 10:336-349.