

El ratón deficiente en apolipoproteína E y su aplicación al estudio de la arteriosclerosis

A. Paul y J. Joven

Centre de Recerca Biomèdica. Hospital Universitari de Sant Joan de Reus. Reus.

Introducción

La arteriosclerosis es una enfermedad multifactorial en la que están involucrados tanto factores genéticos como ambientales. La arteriosclerosis en el ser humano se desarrolla lentamente, por lo que el estudio de los factores de riesgo, así como de las intervenciones destinadas a su prevención tan sólo puede llevarse a cabo mediante estudios epidemiológicos de larga duración. Sin embargo, incluso en los estudios bien diseñados, la interpretación de los resultados es difícil, ya que en ellos no se evalúa directamente el desarrollo de la arteriosclerosis, sino la aparición de episodios clínicos, lo que dificulta discernir si los factores estudiados actúan acentuando o atenuando la aterogénesis, los factores desencadenantes de la trombosis, o varios procesos de manera simultánea.

Con los modelos animales de arteriosclerosis pueden solventarse muchos de los inconvenientes que tienen los estudios clinicoepidemiológicos. Por ejemplo, pueden controlarse la mayoría de las variables dietéticas y ambientales en una población genéticamente homogénea. Los estudios pueden llevarse a cabo en un corto período de tiempo, ya que en muchos de estos animales el proceso de años en el humano equivale a semanas o meses. Obviamente, junto al hecho de su bajo coste y manejabilidad, el hecho de trabajar con animales permite medir muchas variables, especialmente las histológicas, que son difíciles de estudiar en el ser humano. Es evidente, por contra, que trabajar con animales tiene, a su vez, numerosos inconvenientes, siendo el principal de ellos la difícil interpretación de los resultados, si se quieren transferir a los humanos.

Correspondencia: Dr. J. Joven.
Centre de Recerca Biomèdica.
Hospital Universitari de Sant Joan de Reus.
Sant Joan, s/n. 43201 Reus. Tarragona.
Correo electrónico: jjoven@grupsgs.com.

El ratón deficiente en apolipoproteína E como modelo de arteriosclerosis

Los ratones reúnen muchas cualidades que los hacen adecuados para la investigación, pero las cepas salvajes de ratones son resistentes a la arteriosclerosis, ya que sus valores de colesterol plasmático son bajos y éste está distribuido de forma mayoritaria en las HDL. La apolipoproteína E (Apo E) constituye el ligando fundamental para el aclaramiento de los remanentes de quilomicrones y de VLDL y, por tanto, de no existir o funcionar, era posible que dichas partículas se acumularan en plasma. Por ello, en 1992, dos laboratorios, de manera independiente, inactivaron el gen de la Apo E mediante técnicas de recombinación homóloga a partir de células pluripotenciales de cepas de ratones con una mayor predisposición a desarrollar arteriosclerosis, como la C57BL/6J, la 129 Ola y la BALB/cJ^{1,2}. Los ratones carentes de Apo E, incluso alimentados con una dieta pobre en grasas (4% del total de la dieta) y colesterol (0,01% del total de la dieta), presentan concentraciones plasmáticas de colesterol del orden de 10-15 mmol/l, unas cinco o seis veces superiores a los de sus congéneres con Apo E^{2,3}. La hipercolesterolemia se produce a expensas de la acumulación de partículas de tamaños comprendidos en el rango de las VLDL y de las LDL, mientras que el colesterol unido a las HDL disminuye aproximadamente a la mitad (fig. 1). Sin embargo, con esta misma dieta, la concentración plasmática de triglicéridos sólo aumenta un 50-75%⁴.

La acumulación de colesterol plasmático hace que estos ratones desarrollen arteriosclerosis siguiendo una secuencia de acontecimientos similar a la que se da en el ser humano. Entre las 6 y 8 semanas de edad, los monocitos se adhieren a las células endoteliales y los lípidos interactúan con los filamentos de la matriz formando agregados⁵. Las estrías grasas ya abundan en el árbol arterial a temprana edad y, al igual que en el ser humano, las que se distribuyen en los puntos de ramificación y en la parte interna de las curvaturas de las arterias

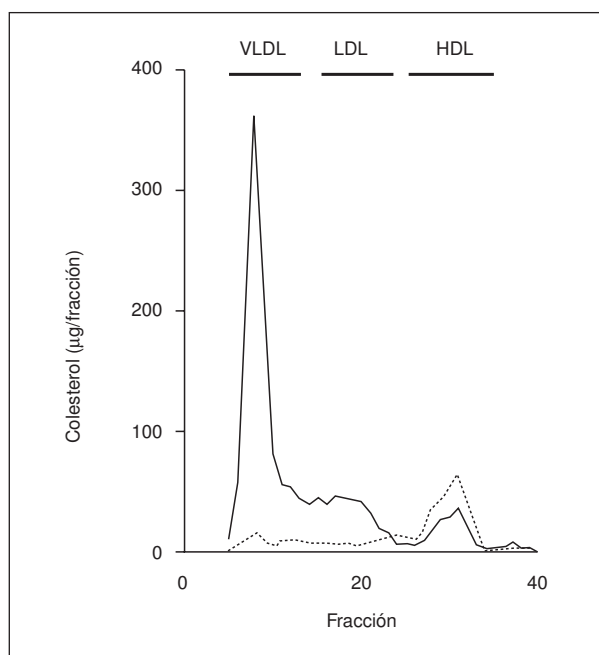


Figura 1. Representación de las concentraciones de colesterol en las fracciones de FPLC de ratones no modificados genéticamente (línea discontinua) y de ratones deficientes en apolipoproteína E (línea continua). VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad.

tienden a evolucionar a placas fibrosas⁶. Por último, las placas fibrosas pueden presentar núcleos necróticos y calcificación⁷, aunque en este modelo animal no se suelen presentar rotura de las placas ni trombosis⁸. Se trata, por tanto, de un modelo animal de hiperlipemia extrema con acumulación de lipoproteínas grandes, no metabolizadas en el plasma, que se acompaña de arteriosclerosis. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que es extraordinariamente reproducible y, por tanto, adecuado para diseños de casos y controles experimentales. Así, se ha diseñado el estudio de diversos factores que presumiblemente intervienen en el desarrollo de la arteriosclerosis.

Efectos de las dietas

De antiguo se ha considerado que la dieta que sigue el individuo a largo plazo tiene una influencia considerable en el desarrollo de la arteriosclerosis, con dietas que protegen frente a la arteriosclerosis o que retrasan la aparición de la enfermedad. La gran ventaja de los modelos animales en el estudio de los efectos de la dieta estriba en que puede controlarse en su totalidad, desaparece el problema de la falta de adherencia y, en el caso del animal que nos ocupa, puede prolongarse a lo largo de toda su vida.

La inactivación del gen de la Apo E redonda en un espectacular incremento del colesterol plasmático, pero éste también puede modificarse aumentando el colesterol de la dieta. Por ejemplo, con una dieta con un contenido de colesterol del 0,1%, el colesterol plasmático puede alcanzar fácilmente los 30 mmol/l y el área de lesión medida en el seno aórtico puede doblar a la de los ratones alimentados con una dieta convencional⁹, mientras que si la dieta contiene un 0,15% de colesterol, las concentraciones plasmáticas pueden sobrepasar los 50 mmol/l y el área de lesión triplicar la de los ratones alimentados con una dieta convencional². Por tanto, a pesar de que la estrategia de probar el efecto de un único nutriente es discutible, ha quedado experimentalmente demostrado que, a mayor colesterolemia, más rápidamente se presentan las lesiones ateromatosas. La suplementación con otros nutrientes lipídicos también se ha estudiado en este modelo animal. El enriquecimiento de la dieta con un 10% de algunos aceites normalmente utilizados en la alimentación disminuye la aterogénesis¹⁰, aunque depende del sexo. En las hembras el aceite de palma y el aceite de oliva rico en ácido oleico incrementan los valores plasmáticos de Apo A-I y disminuyen el tamaño de las lesiones, lo que podría atribuirse a la capacidad de la Apo A-I de inhibir la transformación de los macrófagos en células espumosas¹¹. También disminuye el tamaño de la lesión en los machos cuya dieta se ha suplementado con aceite de girasol, pero en este caso el efecto beneficioso podría atribuirse a la disminución de los triglicéridos en las lipoproteínas que los transportan¹⁰. También se obtienen diferentes respuestas en el metabolismo lipídico entre machos y hembras al suplementar sus dietas con un 1% de ácido docosahexaenoico¹². La adición de aceite de semilla de *Pinus pinaster* a la dieta, a pesar de ejercer un efecto hipolipemiente, no provoca una atenuación de la aterogénesis¹³.

También se han estudiado los efectos de algunos nutrientes no lipídicos. El quitosán, un polisacárido extraído de la concha de los crustáceos, se une en el tracto digestivo a los lípidos de la dieta, inhibe su absorción y provoca un efecto hipocolesterolemizante y antiaterogénico¹⁴. Finalmente, se ha demostrado que cuando su principal fuente proteica es la proteína de soja, los ratones desarrollan menos arteriosclerosis que cuando esta proteína es la caseína¹⁵.

De esta breve enumeración se constata claramente que el modelo ha sido ampliamente utilizado para estudiar distintos nutrientes. Sin embargo, aunque algunos autores defienden el papel de estos animales como modelos⁴, los diseños experimentales

muchas veces crean más dudas que respuestas. Por ejemplo, cuando se estudian nutrientes con valor energético, es difícil valorar la dieta control; las dietas humanas (y animales) son variadas y no repetitivas, por lo que un solo nutriente difícilmente puede tener efectos significativos; también puede ocurrir que el supuesto efecto tenga que ver más con la sustracción (relativa) de un nutriente que con su adición, ya que en una dieta variada tienden a equilibrarse los componentes con acciones contrapuestas, como es el caso de los oxidantes frente a los antioxidantes, etc.

Oxidación y antioxidantes

Dado que la oxidación de las LDL parece ser un proceso clave en el desarrollo de la arteriosclerosis^{16,17}, se han probado o están siendo probadas varias estrategias en el ser humano, en un esfuerzo por prevenir la cardiopatía isquémica. Hasta ahora no se han obtenido resultados concluyentes¹⁸. Disponiéndose de pruebas circunstanciales obtenidas *in vitro* que difícilmente pueden reproducirse *in vivo*; además, el delicado equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, una vez más, puede depender de numerosos factores.

Los procesos oxidativos también parecen contribuir a la aterogénesis en el ratón deficiente en Apo E, lo que se demuestra por la presencia de moléculas oxidadas en las lesiones, como los ésteres de colesterol e isoprostano, y de altos títulos de anticuerpos frente a malondialdehído en su suero^{19,20}. Diversos autores han estudiado el efecto del enriquecimiento de la dieta con antioxidantes. La suplementación con algunos antioxidantes como los polifenoles procedentes del vino tinto²¹, de extractos de regaliz^{22,23} o con N,N'-difetil-1,4-fenilendiamina²⁴, al igual que con algunos fitosteroles²⁵, parece ser protectora frente al desarrollo de la arteriosclerosis. Por otra parte, una dieta pobre en hierro produce una disminución significativa de la lesión, que podría atribuirse a una disminución de la oxidación de las LDL en la pared arterial²⁶. Sin embargo, la protección de los antioxidantes no ha podido ser demostrada con el betacaroteno²⁷, mientras que los resultados de los estudios en que se ha empleado vitamina E, el principal antioxidante en las LDL, han sido discordantes²⁷⁻²⁹. Por si fuera poco, ha de citarse el efecto paradójico del probucol^{25,30}, un compuesto que no sólo es un potente antioxidante sino un hipolipemiante y que aumenta las lesiones ateromatosas en los ratones deficientes en Apo E, lo que se pretende justificar como un efecto tóxico del fármaco en este particular modelo. No puede descartarse, claro está, que este modelo no sea adecuado.

Los médicos precisamos respuestas claras para poder ofrecérselas a nuestros pacientes; sin embargo, no parece existir un tratamiento claro que nos proteja frente a la oxidación. El consumo de antioxidantes, sobre todo en el mercado americano, aumenta, pero nos tememos que los trabajos realizados con este modelo animal no contribuyan a su justificación.

Bases moleculares de la aterogénesis

La similitud del proceso aterogénico y el hecho de que estén involucradas las mismas células que en el ser humano hacen del ratón deficiente en Apo E un modelo atractivo para el estudio del papel de las moléculas que participan en el desarrollo de la arteriosclerosis^{31,32}. En algunos de estos estudios, se ha evaluado el papel de varias de las principales citocinas relacionadas con la inflamación, y se ha demostrado que en este modelo animal, modificaciones supuestamente antiinflamatorias, como la supresión del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF)³³ y la ausencia o la inhibición de los receptores para la proteína quimiotáctica derivada de macrófagos (MCP-1)³⁴ y para la interleucina (IL)-1, tienen efectos claramente antiaterogénicos, mientras que la inhibición del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)³⁵ tan sólo resulta efectiva en las hembras. Se ha demostrado, también, una relación directa entre la expresión de la citocina proinflamatoria IL-6 y el desarrollo de la arteriosclerosis³⁶ y una exacerbación de la aterogénesis por la MCP-1³⁷.

La sobreexpresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio, que facilitan la penetración de células inflamatorias hacia la pared, está considerada como un paso clave en la aterogénesis³⁸. En el ratón deficiente en Apo E, el ICAM-1 y el VCAM-1 son sobreexpresados en las áreas arteriales con mayor predisposición a desarrollar arteriosclerosis^{39,40} y su expresión se incrementa en respuesta al daño endotelial⁴¹. Este modelo se ha utilizado también para probar el papel fundamental de las adhesinas en la estabilización del rodamiento de los macrófagos en los lugares del árbol arterial con un flujo predisponente a la arteriosclerosis⁴². Por último, abundando en la importancia de las adhesinas en el desarrollo de la arteriosclerosis, se ha demostrado que la deficiencia de algunas de estas moléculas⁴³ o su inhibición mediante anticuerpos monoclonales es antiaterogénica⁴⁴.

A pesar de que es un hecho aceptado que la arteriosclerosis está causada por una inflamación crónica de la pared arterial, los tratamientos utilizados en la actualidad en la prevención de las enfermedades cardiovasculares no incluyen el uso de antiinflamatorios.

torios. En el ratón deficiente en Apo E el desarrollo de la arteriosclerosis depende de componentes claramente relacionados con la inflamación como las citocinas proinflamatorias y las moléculas de adhesión celular, por lo que el modelo parece ser útil para evaluar la importancia de la inflamación en el desarrollo de la enfermedad y para ensayar el uso de antiinflamatorios en su prevención. Según esto, recientemente hemos tratado a estos ratones con dosis antiinflamatorias de ácido acetilsalicílico, obteniendo una disminución del 35% en el desarrollo de la arteriosclerosis, que sugiere claramente la necesidad de continuar investigando sobre el uso de antiinflamatorios en la prevención de la arteriosclerosis⁴⁵.

Las hormonas

Los datos epidemiológicos son indicativos de que los estrógenos tienen efectos antiaterogénicos. Sin embargo, la magnitud de este efecto y los mecanismos involucrados no están bien definidos, por lo que su estudio en modelos animales puede resultar de gran utilidad. Algunos investigadores han utilizado este modelo animal para estudiar el efecto del tratamiento con 17-β estradiol sobre el desarrollo de la arteriosclerosis, obteniendo una franca disminución del área de lesión^{46,47} que podría estar mediada por una disminución de la síntesis de IL-6³⁶.

Por otra parte, a la angiotensina-II, una hormona vasoactiva, se le han atribuido efectos proaterogénicos mediados por un incremento de la peroxidación lipídica y de la disfunción endotelial^{48,49}. La administración continuada de angiotensina-II exacerba la aterogénesis en estos ratones⁵⁰, mientras que su inhibición, ya sea mediante la administración de antagonistas de su receptor^{50,51} o de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)^{52,53}, atenúa el desarrollo de la arteriosclerosis.

La disminución de la aterogénesis obtenida con los estrógenos reafirma la importancia de estas hormonas en el desarrollo de la arteriosclerosis y apoya la generalización del tratamiento hormonal sustitutivo en mujeres. Por otra parte, los resultados obtenidos con IECA y la disponibilidad de inhibidores poco tóxicos, ya utilizados crónicamente, sugieren la necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos con estos fármacos en los que debería incluirse también a individuos normotensos.

Conclusión

La arteriosclerosis en el ratón deficiente en Apo E es similar a la del ser humano, es claramente dependiente de las concentraciones plasmáticas de colesterol, están implicados los mismos tipos celulares y moleculares, y su magnitud parece estar

modulada por factores hormonales. El modelo parece ser útil para estudiar los efectos de los nutrientes y de los antioxidantes, aunque hay datos discrepantes. Por otra parte, además de contribuir al conocimiento de factores largamente estudiados en el desarrollo de la arteriosclerosis, como los relacionados con la dieta y con la oxidación, la disponibilidad de éste y de otros modelos animales deberían facilitar la exploración de nuevas estrategias antiaterogénicas de una manera rápida y relativamente fiable, que sirvan de guía para el diseño de nuevos estudios epidemiológicos.

En definitiva, el ratón deficiente en Apo E parece ser un buen modelo animal de arteriosclerosis. Su disponibilidad puede facilitar el conocimiento de los factores involucrados en la aterogénesis y en la realización de estudios nutricionales, ensayos farmacológicos preclínicos y manipulaciones genéticas de una manera relativamente rápida y poco costosa. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos estudios deben interpretarse con cautela y en ningún caso pueden darse por concluyentes.

Bibliografía

1. Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver P, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E-gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 82: 4471-4475.
2. Plump A, Smith J, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: 343-353.
3. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258: 468-471.
4. Osada J, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 25-29.
5. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 847-853.
6. 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: 133-140.
7. Tse J, Martin-McNulty B, Halks-Miller M, Kauser K, DelVecchio V, Vergona R. Accelerated atherosclerosis and premature calcified cartilaginous metaplasia in the aorta of diabetic male Apo E knockout mice can be prevented by chronic treatment with 17 beta-estradiol. *Atherosclerosis* 1999; 144: 303-313.
8. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996; 272: 685-688.
9. Paul A, Calleja L, Vilella E, Martínez R, Osada J, Joven J. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Atherosclerosis* 1999; 147: 61-68.
10. Calleja L, París MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jiménez A et al. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in Apo E-Knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2368-2375.
11. Dansky HM, Charlton SA, Sikes JL, Heath SC, Simantov R, Levin LF et al. Genetic background determines the extent of atherosclerosis in Apo E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1960-1968.
12. Adan Y, Shibata K, Ni W, Tsuda Y, Sato M, Ikeda I et al. Concentration of serum lipids and aortic lesion size in female and male apo E-deficient mice fed docosahexaenoic acid. *Biosci Biotech Biochem* 1999; 63: 309-313.

13. Asset G, Bauge E, Wolff RL, Fruchart JC, Dallongeville J. *Pinus pinaster* oil affects lipoprotein metabolism in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 1999; 129: 1972-1978.
14. Ormrod DJ, Holmes CC, Miller TE. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 138: 329-334.
15. Ni W, Tsuda Y, Sakono M, Imaizumi K. Dietary soy protein isolate, compared with casein, reduces atherosclerotic lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 1998; 128: 1884-1889.
16. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344: 793-795.
17. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature (Lond)* 1993; 362: 801-809.
18. Hennekens CH. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease: current knowledge and future directions. *Nutrition* 1998; 14: 50-51.
19. Letters JM, Witting PK, Christison JK, Eriksson AW, Petterson K, Stocker R. Time-dependent changes to lipids and antioxidants in plasma and aortas of apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res* 1999; 40: 1104-1112.
20. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. Apo E-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 605-616.
21. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2744-2752.
22. Rosenblat M, Belinky P, Vaya J, Levy R, Hayek T, Coleman R et al. Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin inhibits NADPH oxidase-induced cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. A possible role for protein kinase C. *J Biol Chem* 1999; 274: 13790-13799.
23. Fuhrman B, Buch S, Vaya J, Belinky PA, Coleman R, Hayek T et al. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 267-275.
24. Tangirala RK, Casanada F, Miller F, Witztum JL, Steinberg D, Palinski W. Effect of the antioxidant N,N'-diphenyl 1,4-phenylenediamine (DPPD) on atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1625-1630.
25. Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B, Frohlich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation* 1999; 99: 1733-1739.
26. Lee TS, Shiao MS, Pan CC, Chau LY. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in Apo E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99: 1222-1229.
27. Shaish A, George J, Gilburd B, Keren P, Levkovitz H, Harats D. Dietary β -carotene and α -tocopherol combination does not inhibit atherogenesis in an Apo E-deficient mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1470-1475.
28. Praticò D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, Fitzgerald GA. Vitamin E suppresses isoprostane generation *in vivo* and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med* 1998; 4: 1189-1192.
29. Maor I, Hayek T, Coleman R, Aviram M. Plasma LDL oxidation leads to its aggregation in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2995-3005.
30. Zhang SH, Reddick RL, Avdievich E, Surlis LK, Jones RG, Reynolds JB et al. Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2858-2866.
31. Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
32. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250.
33. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 1997; 150: 1687-1699.
34. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999; 143: 205-211.
35. Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1998; 97: 242-244.
36. Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, DeVecchio V, HalksMiller M, Rubanyi GM. Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17 beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1498-1505.
37. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ et al. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1518-1525.
38. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96: 4219-4225.
39. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 842-851.
40. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999; 85: 199-207.
41. Manka DR, Wiegman P, Din S, Sanders JM, Green SA, Gimble LW et al. Arterial injury increases expression of inflammatory adhesion molecules in the carotid arteries of apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res* 1999; 36: 372-378.
42. Ramos CL, Huo Y, Yung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ et al. Direct demonstration of P-selectin and VCAM-1 dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 1999; 84: 1237-1244.
43. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intracellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191: 189-194.
44. Patel SS, Thiagarajan R, Willerson JT, Yeh ET. Inhibition of α 4-integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in Apo E-deficient mice. *Circulation* 1998; 97: 75-81.
45. Paul A, Calleja L, Camps J, Osada J, Vilella E, Ferré N et al. The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci* 2000; 68: 457-465.
46. Elhage R, Bayard F, Richard V, Holvoet P, Duverger N, Fievet C et al. Prevention of fatty streak formation of 17 beta-estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1997; 96: 3048-3052.
47. Elhage R, Arnal JF, Pieraggi MT, Duverger N, Fievet C, Faye JC et al. 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Art Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2679-2684.
48. Dzau VJ. Cell biology and genetics of angiotensin in cardiovascular disease. *J Hypertens* 1994; 12: S3-S10.
49. Keidar S. Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci* 1998; 63: 1-11.
50. Keidar S, Attias J, Heinrich R, Coleman R, Aviram M. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. *Atherosclerosis* 1999; 146: 249-257.
51. Keidar S, Attias J, Smith J, Breslow JL, Hayek T. The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 622-625.
52. Hayek T, Attias J, Smith J, Breslow JL, Keidar S. Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharm* 1998; 31: 540-544.
53. Keidar S, Attias J, Coleman R, Wirth K, Scholkens B, Hayek T. Attenuation of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by ramipril is dissociated from its antihypertensive effect and from potentiation of bradykinin. *J Cardiovasc Pharm* 2000; 35: 64-72.