

# Las bebidas cola aceleran el crecimiento de la placa aterosclerótica en ratones ApoE<sup>-/-</sup>

## Cola Beverages Accelerate Growth of the Atherosclerotic Plaque in ApoE<sup>-/-</sup> Mice

ENRIQUETA M. SERAFINI, MATILDE E. OTERO-LOSADA, GABRIEL CAO, GASTÓN RODRÍGUEZ-GRANILLO, JIMENA AGUILERA, ANGÉLICA MÜLLER, GRACIELA OTTAVIANO, FRANCISCO AZZATO, JOSÉ MILEI<sup>MTSAC</sup>

Recibido: 26/11/2013  
Aceptado: 17/02/2014

**Dirección para separatas:**  
Dr. José Milei  
(ININCA) Instituto de Investigaciones Cardiológicas UBA - CONICET  
Marcelo T. de Alvear 2270 (C1122AAJ) CABA - Argentina  
Tel./Fax +54 +11 4508-3836  
e-mail: ininca@fmed.uba.ar

### RESUMEN

#### Introducción

Los hábitos de alimentación poco saludables durante la infancia y la juventud se han sugerido como favorecedores de las complicaciones ateroscleróticas en edades más avanzadas. El creciente consumo de bebidas cola en las últimas décadas se ha asociado con el desarrollo de obesidad e incremento en la incidencia de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. A su vez, se sabe que existe correspondencia entre el consumo de estas bebidas y etapas de la vida, el cual es mayor en los niños, los adolescentes y los adultos jóvenes.

#### Objetivo

Evaluar el efecto del consumo de bebidas cola sobre la aterosclerosis.

#### Material y métodos

Se distribuyeron ratones ApoE<sup>-/-</sup> (8 semanas de edad) en tres grupos según el consumo libre de agua (A), bebida cola azucarada (C) y bebida cola edulcorada *light* (L). Al cabo de 8 semanas las bebidas cola se reemplazaron por agua. Los ratones fueron sacrificados secuencialmente: antes del tratamiento (8 semanas de edad) y luego de su interrupción (16, 20, 24 y 30 semanas de edad). Se extrajeron la aorta ascendente y el hígado. Se calculó la relación entre el área de la placa aórtica y el espesor de la capa media (relación placa/media). Se evaluó la inflamación del parénquima hepático según la escala de NASH.

#### Resultados

La relación placa/media varió según la bebida ( $F_{2,54} = 3,433$ ,  $p < 0,04$ ) y la edad ( $F_{4,54} = 5,009$ ,  $p < 0,03$ ) y fue mayor en los grupos C y L ( $p < 0,05$  a las 16 y 20 semanas,  $p < 0,01$  a las 24 y 30 semanas). La inflamación del parénquima hepático ( $F_{2,9} = 13,29$ ,  $p < 0,002$ ) y portal ( $F_{2,9} = 6,30$ ,  $p < 0,02$ ) aumentó cinco y dos veces, respectivamente, en función del tiempo ( $p < 0,01$  y  $p < 0,03$ ) entre las semanas 20 y 30, en contraste con la esteatosis y el daño hepatocelular, que no se modificaron. El grupo A (evolución natural de la aterosclerosis) se caracterizó por la aceleración del crecimiento del área de placa en paralelo con un rápido aumento de la inflamación hepática alrededor de la semana 20.

#### Conclusiones

El consumo de bebidas cola en ratones ApoE<sup>-/-</sup> entre las semanas 8 y 16 de edad aumentó la tasa de progresión de la aterosclerosis. Los datos sugieren que, en este modelo murino, el consumo sostenido de bebidas cola durante las etapas tempranas de la vida puede acelerar el agravamiento del daño aterosclerótico en etapas más tardías.

REV ARGENT CARDIOL 2014;82:133-138. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v82.i2.4027>

**Palabras clave >** Aterosclerosis - Bebidas gaseosas - Apolipoproteína E

### INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es responsable de la principal causa de muerte en el mundo (1) y su riesgo aumenta con la

edad. (2) Los hábitos de alimentación poco saludables durante la infancia y la juventud se han sugerido como favorecedores de las complicaciones ateroscleróticas en edades más avanzadas. (3, 4) Varios estudios de

tipo longitudinal han demostrado el aumento del riesgo cardiovascular en la edad adulta de los niños obesos, (5, 6) y también que la exposición a factores de riesgo cardiovascular en edades tempranas de la vida puede contribuir al desarrollo de aterosclerosis. (7) El creciente consumo de bebidas cola en las últimas décadas se ha asociado con el desarrollo de obesidad e incremento en la incidencia de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares. A su vez, se sabe que existe correspondencia entre el consumo de estas bebidas con etapas de la vida, el cual es mayor en los niños, los adolescentes y los adultos jóvenes. Recientemente hemos observado el desarrollo de síndrome metabólico después del consumo prolongado de bebidas cola en ratas. (8, 9) Se observó el desarrollo de hipertensión, hiperglucemia, aumento del peso corporal, dislipidemia y alteraciones ecocardiográficas, mientras que los hallazgos histopatológicos no fueron consistentes y se relacionaron más con el proceso de envejecimiento que con el tratamiento. (8, 9) También observamos que los ratones ApoE<sup>-/-</sup> C57BL/6J son particularmente sensibles a los daños derivados del consumo de bebidas cola. La bebida cola endulzada con sacarosa (C) produjo patología arterial asociada con el desarrollo de hiperglucemia. (10) El consumo de C o L produjo indistintamente aumento del área de la placa (28% C, 50% L) y estenosis aórtica (38% C, 57% L). (10) Paradójicamente, luego de la interrupción del consumo de bebidas cola, las lesiones empeoraron (aumento del área de placa: 43% C, 68% L y estenosis: 71% C, 46% L). Una explicación probable es que el período de recuperación haya sido insuficiente para que se pudiera observar reversión alguna del daño arterial, considerando que las determinaciones se realizaron únicamente al final del tratamiento y no se evaluó la secuencia temporal de la evolución posterior. La edad se asoció con un aumento de las lesiones ateroscleróticas (56%).

El objetivo de este estudio fue explorar el impacto del consumo de bebidas cola en la progresión del daño arterial en ratones ApoE<sup>-/-</sup> (modelo murino de aterosclerosis) (11) a diferentes tiempos luego de la interrupción del tratamiento. La hipótesis puesta a prueba fue que el consumo de bebidas cola en etapas tempranas de la vida podría afectar el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis en edades adultas.

Dado que la bibliografía indica la participación de procesos inflamatorios a nivel hepático en el desarrollo y la evolución de la aterosclerosis, fue de interés evaluar los posibles cambios en el hígado en respuesta al consumo de bebidas cola en este modelo murino. En particular se evaluó la asociación temporal entre el daño hepático y las lesiones ateroscleróticas. La evidencia experimental muestra que la deficiencia de ApoE<sup>-/-</sup> se relaciona con la expresión hepática de mediadores proinflamatorios (12) y aceleradores del envejecimiento. (13)

A pesar de la amplia utilización de los ratones ApoE<sup>-/-</sup> para múltiples propósitos, la relación entre las lesiones ateroscleróticas y hepáticas aún no es clara. (14)

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos descriptos en este estudio fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL) y se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones del informe Weatherall. (15)

Un lote de sesenta ratones con deficiencia genética de Apo E (ApoE<sup>-/-</sup>) C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) se alimentaron *ad libitum* con comida comercial estándar para roedores (16-18% de proteínas, 0,2 g% de sodio, Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y se alojaron en un bioterio con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. A las 8 semanas de edad los ratones ApoE<sup>-/-</sup> fueron distribuidos al azar en tres grupos (n = 20 cada uno). Cada grupo tuvo libre acceso a una de las siguientes bebidas (temperatura ambiente): agua (A), bebida cola común (C) (bebida cola endulzada con sacarosa, Coca-Cola®, Argentina) y bebida cola *light* (L) (bebida cola edulcorada con aspartame y acesulfame K, Coca-Cola Light®, Argentina) durante 8 semanas. El dióxido de carbono de las bebidas cola se eliminó por agitación energética por el tiempo necesario hasta su eliminación total.

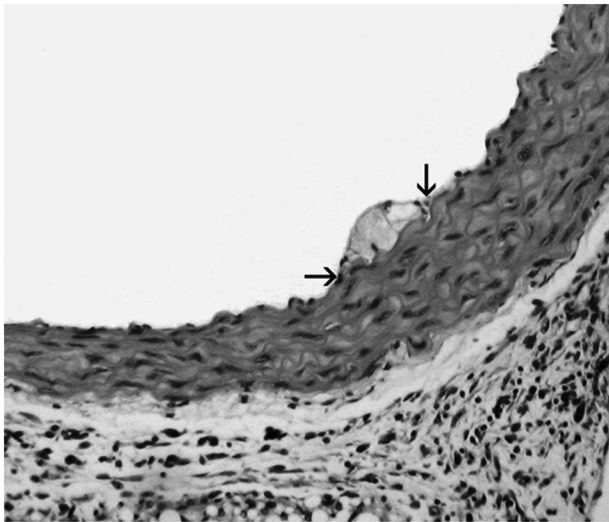
Al cabo de las 8 semanas de tratamiento, las bebidas cola fueron reemplazadas por agua en los grupos C y L. Se sacrificaron secuencialmente 4 ratones por grupo bajo anestesia con solución de pentobarbital sódico-difenilhidantoína sódica (Euthanyl®): antes del tratamiento (8 semanas de edad: A<sub>8</sub>, C<sub>8</sub> y L<sub>8</sub>), al final del tratamiento (16 semanas de edad: A<sub>16</sub>, C<sub>16</sub> y L<sub>16</sub>) y después de su interrupción (20 semanas de edad: A<sub>20</sub>, C<sub>20</sub> y L<sub>20</sub>; 24 semanas de edad: A<sub>24</sub>, C<sub>24</sub> y L<sub>24</sub>; 30 semanas de edad: A<sub>30</sub>, C<sub>30</sub> y L<sub>30</sub>).

Se extrajo tejido de la aorta ascendente y del hígado, que fue disecado y sumergido en *buffer* de formaldehído al 10% (solución *buffer* de formalina al 10%, pH 7,0) a temperatura ambiente durante un período de 24 horas. Luego de la deshidratación (soluciones de concentración creciente de alcohol etílico al 50%, 70%, 100%), los tejidos se incluyeron en bloques de parafina. Se obtuvieron seis secciones transversales seriadas de la aorta de 5 µm a nivel del origen de las valvas de la válvula aórtica y en todo el seno aórtico y se colorearon con hematoxilina-eosina, colorante tricrómico de Masson y orceína para la identificación de fibras elásticas. Cada una de las secciones se evaluó utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 acoplado a un programa (Image Pro Plus para Windows, v3) para analizar y promediar los datos. Se midieron el área de la placa, la capa íntima y el espesor de la capa media. Se calculó la relación entre el área de la placa y la capa media (relación placa/media) para estimar el grado de remodelación arterial. (15) Se procesaron secciones de hígado de 4 µm para microscopia y se determinó el grado de inflamación del parénquima de acuerdo con la escala de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), (16) cuya puntuación va de 0 a 4 (0 = más baja, 4 = más alta) e incluye esteatosis, inflamación del parénquima, lesión hepatocelular, inflamación portal y fibrosis.

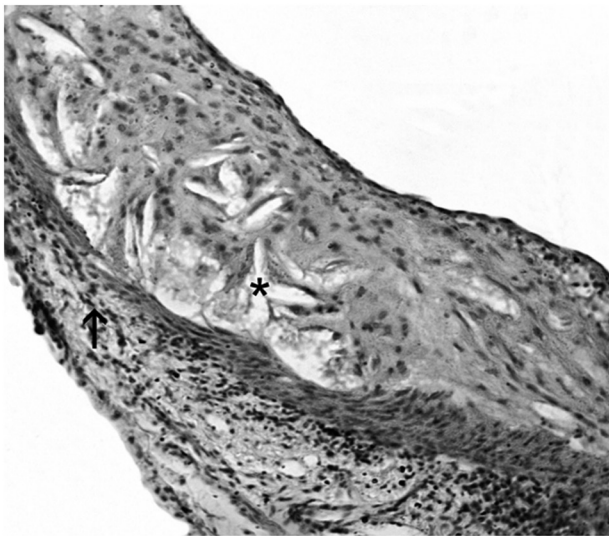
Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis multivariado de la varianza (MANOVA). Para identificar los factores responsables de la variación de los resultados se utilizó el modelo de ANOVA factorial. A continuación, la prueba *post hoc* de Dunnett permitió evaluar las diferencias entre grupos experimentales de la misma edad a lo largo del estudio. El límite de significación estadística se fijó convencionalmente en  $p < 0,05$  (*software* SPSS® versión 17.0).

**RESULTADOS**

Desde el punto de vista cualitativo, en el momento de la autopsia se observaron acumulaciones focales de macrófagos cargados de lípidos en ratones de 16 semanas de edad (Figura 1). Los ratones de 20 y 24 semanas de edad mostraron cúmulos globulares de macrófagos agrupados cubiertos por una capa fibrosa fina (Figura 2). En la semana 30 se observaron grandes xantomas necróticos acelulares formando un nódulo fibrograso que se extendía desde la luz hasta la lámina elástica interna. El calibre luminal se redujo en gran medida



**Fig. 1.** Imagen histológica correspondiente a la pared aórtica de un ratón de 16 semanas de edad. Se observa un cúmulo de macrófagos conteniendo microvacuolas lipídicas intracitoplasmáticas (células espumosas) inmediatamente por debajo del endotelio vascular (entre flechas). H&E, 20x.

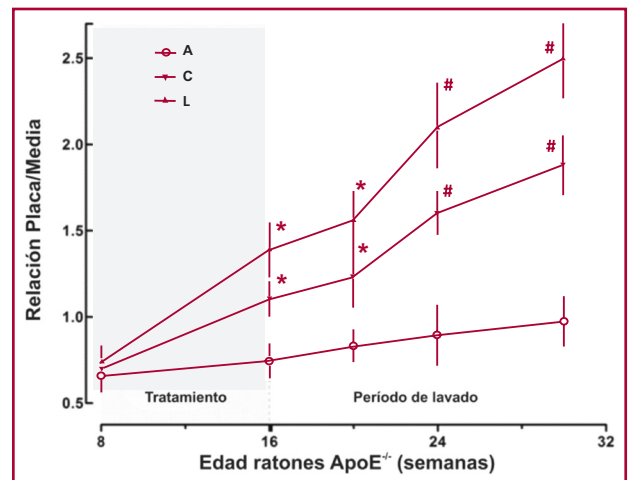


**Fig. 2.** Imagen histológica correspondiente a la pared aórtica de un ratón de 20-24 semanas de edad. Se observan depósitos de cristales de colesterol (asterisco) incluidos en un tejido fibrocelular que expande la capa íntima vascular comprimiendo la capa muscular (flecha). H&E, 10x.

debido al adelgazamiento y pérdida de la capa fibrosa. Se observó interrupción de la lámina elástica interna junto con atrofia extensa de la capa media, la cual fue reemplazada por componentes de la placa (Figura 3). La relación placa/media varió de acuerdo con el tratamiento ( $F_{2,54} = 3,433, p < 0,04$ ) y con la edad de los ratones ( $F_{4,54} = 5,009, p < 0,03$ ) y fue mayor en los grupos C y L en comparación con ratones de la misma edad del grupo A ( $p < 0,05$  a las 16 y 20 semanas,  $p < 0,01$  a las 24 y 30 semanas) (Figura 4). Los ratones Apo E<sup>-/-</sup> que nunca consumieron bebidas cola (grupo A) desarrollaron espontáneamente cambios acelerados en el crecimiento de la placa aterosclerótica en paralelo con un rápido aumento de la inflamación del hígado alrededor de las 20 semanas de edad (Figura 5). La

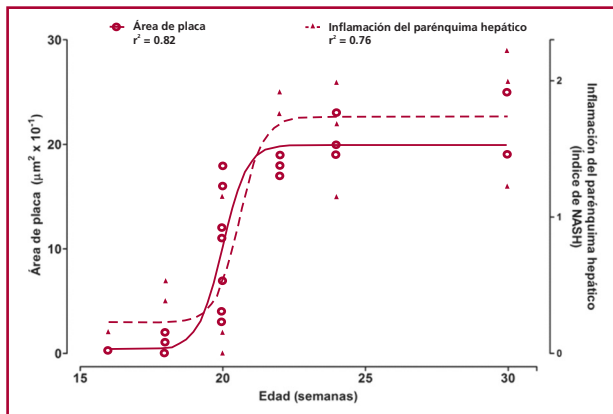


**Fig. 3.** Imagen histológica representativa de una lesión íntima aórtica de un ratón de 30 semanas de edad, caracterizada por grandes acumulaciones lipídicas acelulares (asteriscos) y de aspecto xantomatoso, contenidas en un tejido fibroso (flechas), en sectores densos, constituyendo formaciones nodulares que protruyen hacia la luz vascular. Tricrómico de Masson, 10x.



**Fig. 4.** Efecto del consumo de bebidas cola en la relación placa/media en ratones ApoE<sup>-/-</sup> durante el tiempo de estudio. Ordenadas: relación placa/media. Abscisas: edad (semanas). \*  $p < 0,05$ , #  $p < 0,01$  comparado con A para la misma edad.





**Fig. 5.** Área de placa e inflamación del parénquima hepático en ratones ApoE<sup>-/-</sup> luego de la interrupción del tratamiento con bebidas cola. Ordenadas: área de placa ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ). Abscisas: edad (semanas).

inflamación del parénquima hepático ( $F_{2,9} = 13,29$ ,  $p < 0,002$ ) y la inflamación portal ( $F_{2,9} = 6,30$ ,  $p < 0,02$ ) variaron en función del tiempo (es decir, edad de los ratones) aumentando 5 y 2 veces ( $p < 0,01$  y  $p < 0,03$ ), respectivamente, entre las semanas 20 y 30, en contraste con la esteatosis y el daño hepatocelular, que no se modificaron a lo largo del estudio (Figura 5).

## DISCUSIÓN

La aceleración del crecimiento de la placa aterosclerótica fue mayor en los grupos C y L en comparación con el grupo A a lo largo del estudio. En una etapa anterior de esta investigación observamos el agravamiento paradójico de la aterosclerosis tras la interrupción del consumo de bebidas cola. (10) Sin embargo, la interpretación de estos resultados podría ser cuestionada al considerar que las determinaciones se habían realizado en un único punto temporal luego de finalizado el tratamiento y el período de recuperación podría haber sido insuficiente para observar reversión del daño. Los resultados hallados en el presente estudio nos permiten descartar esa explicación alternativa y confirman el crecimiento acelerado de las lesiones ateroscleróticas en función del tiempo luego de la interrupción del consumo de bebidas cola. El crecimiento acelerado de las lesiones ateroscleróticas observado en los animales tratados (que consumieron bebidas cola a edad temprana) superó al crecimiento asociado con la evolución natural de la aterosclerosis observada en los animales que nunca consumieron bebidas cola. En estudios recientes se ha referido que el safrole-2',3'-óxido (SFO), principal metabolito del safrol (componente de sasafrás del aceite de nuez moscada), se encuentra en las bebidas cola y podría contribuir a agravar las lesiones ateroscleróticas en los ratones ApoE<sup>-/-</sup>. (17)

En el grupo L se observó una progresión acelerada de la aterosclerosis en comparación con los grupos A y C

para animales de la misma edad a los distintos tiempos estudiados. Recientemente se informó un aumento en la actividad de las transaminasas hepáticas (2,8 veces) junto con hiperuremia (74%) e hipercreatininemia (2,5 veces) luego del consumo de bebida cola *light* en este modelo murino. (10) En este contexto de conocimiento, los hallazgos de nuestro estudio sugieren la participación de alteraciones funcionales a nivel del hígado, riñón y/o músculo, como mecanismo involucrado en la aceleración de la aterosclerosis en ratones ApoE<sup>-/-</sup> después de la interrupción del consumo de bebidas cola y aportan evidencia reafirmando que los ratones ApoE<sup>-/-</sup> son idiosincráticamente sensibles al consumo de bebidas cola con referencia al daño arterial. En esta instancia, discutir los posibles mecanismos efectivamente responsables de las conclusiones de este estudio sería especulativo, ya que no hemos efectuado determinaciones al respecto. En todo caso, cabe destacar que una desregulación en el complejo diálogo entre mediadores de mecanismos de inflamación, procoagulación y peroxidación, por mencionar algunos, y el sistema vascular se hallaría implicada en los hallazgos actuales. (18-20)

Los ratones ApoE<sup>-/-</sup> que no consumieron bebidas cola (es decir, el Grupo A) mostraron cambios acelerados en el crecimiento de la placa aterosclerótica, que estarían acompañados por un rápido aumento de la inflamación hepática en torno de las 20 semanas de edad. Estos resultados relativos a la evolución natural de las lesiones ateroscleróticas en ratones ApoE<sup>-/-</sup> concuerdan con los hallados por Watson y colaboradores, quienes encontraron aceleración espontánea de las lesiones ateroscleróticas alrededor de las 20 semanas de vida en este modelo murino. (21) El paralelismo cronológico observado entre el aumento del área de la placa aórtica y la inflamación del hígado en este estudio podría reflejar la expresión periférica de alteraciones a nivel genético, como se ha observado recientemente. (22) En conjunto, las investigaciones publicadas usando este modelo murino enfatizan la participación clave del hígado en el proceso de aterogénesis. La evidencia experimental confirma la existencia de interacciones hígado-arteria, ilustrando así el diálogo entre órganos a distancia en la aterosclerosis. (23)

## CONCLUSIONES

El consumo de bebidas cola, independientemente del contenido de azúcar, aumentó la tasa de progresión de la aterosclerosis en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, 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 de edad no revirtieron incluso mucho tiempo después de la interrupción del tratamiento (ratones de 30 semanas de edad). 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 etapas más tardías, en un

escenario genéticamente favorable, tal como es el caso de los ratones ApoE<sup>-/-</sup> propensos a la aterosclerosis.

## ABSTRACT

### Cola Beverages Accelerate Growth of the Atherosclerotic Plaque in ApoE<sup>-/-</sup> Mice

#### Introduction

Unhealthy eating habits during childhood and youth have been suggested as predisposing factors to atherosclerotic complications later in life. The growing consumption of cola beverages in recent decades has been associated with the development of obesity and increased incidence of atherosclerosis and cardiovascular disease. We also know that there is a correspondence between the consumption of these beverages and the different stages of life, being higher in children, adolescents and young adults.

#### Objective

This study evaluates the effect of cola beverage consumption on atherosclerosis.

#### Methods

ApoE<sup>-/-</sup> mice (8 week-old) were randomized into 3 groups according to free access to water (W), sucrose sweetened carbonated cola drink (C) or aspartame-acesulfame K sweetened carbonated 'light' cola drink (L). At 8 weeks cola beverages were switched to water. The mice were sequentially euthanized: before treatment (8 week old mice) and after treatment discontinuation (20, 24, and 30 week old mice). The ascending aorta and the liver were removed. Aortic plaque area was analyzed and plaque/media-ratio was calculated. Hepatic inflammation was assessed according to the NASH scale.

#### Results

Plaque/media-ratio varied according to drink treatment ( $F_{2,54}=3.433$ ,  $p < 0.04$ ) and age ( $F_{4,54}=5.009$ ,  $p < 0.03$ ) and was higher in the C and L groups ( $p < 0.05$  at 16 and 20 weeks,  $p < 0.01$  at 24 and 30 weeks). Hepatic parenchymal inflammation ( $F_{2,9}=13.29$ ,  $p < 0.002$ ) and portal inflammation ( $F_{2,9}=6.30$ ,  $p < 0.02$ ) varied fivefold and twofold in contrast to steatosis and hepatocellular damage which remained unchanged throughout the study.

Natural evolution of atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice (W group) evidenced acceleration of plaque growth in parallel with a rapid increase in hepatic inflammation around week 20 of age.

#### Conclusions

Cola beverage consumption in 8-16 week old ApoE<sup>-/-</sup> mice accelerated atherosclerosis progression. Data suggest that, in this murine model, sustained cola consumption at early stages of life may predispose to atherosclerosis progression later in life.

**Key words** > Carbonated Beverages - Atherosclerosis - Apolipoproteins E

#### Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

#### 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

- Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J BiomedSci* 2012;19:22. <http://doi.org/rkk>
- Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Aortic atherosclerotic plaque injury in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 1998;140:297-305. <http://doi.org/fmcm7f>
- Mahe G, Carsin M, Zeeny M, De Bosschere JP. Dietary pattern, a modifiable risk factor that can be easily assessed for atherosclerosis vascular disease prevention in clinical practice. *Public Health Nutr* 2011;14:319-26. <http://doi.org/d7974r>
- Räsänen M, Lehtinen JC, Niinikoski H, Keskinen S, Ruottinen S, Salminen M, et al. Dietary patterns and nutrient intakes of 7-year-old children taking part in an atherosclerosis prevention project in Finland. *J Am Diet Assoc* 2002;102:518-24. <http://doi.org/fmvxzz>
- Cornier MA, Marshall JA, Hill JO, Maahs DM, Eckel RH. Prevention of overweight/obesity as a strategy to optimize cardiovascular health. *Circulation* 2011;124:840-50. <http://doi.org/fsx567>
- Li S, Chen W, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Urbina EM, et al. Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *JAMA* 2003;290:2271-6. <http://doi.org/djfkzf>
- Raitakari OT, Juonala M, Kähönen M, Taittonen L, Laitinen T, Mäki-Torkko N, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* 2003;290:2277-83. <http://doi.org/cn2hbd>
- Otero-Losada ME, Grana DR, Müller A, Ottaviano G, Ambrosio G, Milei J. Lipid profile and plasma antioxidant status in sweet carbonated beverage-induced metabolic syndrome in rat. *Int J Cardiol* 2011;146:106-9. <http://doi.org/fcsvx7>
- Milei J, Otero-Losada M, Gómez Llambí H, Grana DR, Suárez D, Azzato F, et al. Chronic cola drinking induces metabolic and cardiac alterations in rats. *World J Cardiol* 2011;3:111-6. <http://doi.org/d432bf>
- Otero-Losada ME, Loughlin SM, Rodríguez-Granillo G, Müller A, Ottaviano G, Moriondo M, et al. Metabolic disturbances and worsening of atherosclerotic lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice after cola beverages drinking. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:57. <http://doi.org/rkm>
- Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, Vasquez EC. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis* 2011;10:211. <http://doi.org/fxck4z>
- Yin M, Zhang L, Sun XM, Mao LF, Pan J. Lack of apoE causes alteration of cytokines expression in young mice liver. *Mol Biol Rep* 2010;37:2049 e54. <http://doi.org/b4373z>
- Bonomini F, Filippini F, Hayek T, Aviram M, Keidar S, Rodella LF, et al. Apolipoprotein E and its role in aging and survival. *Exp Gerontol* 2010;45:149 e57. <http://doi.org/cqqh9c>
- Alkhoury N, Tamimi TA, Yerian L, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. The inflamed liver and atherosclerosis: a link between histologic severity of nonalcoholic fatty liver disease and increased cardiovascular risk. *Dig Dis Sci* 2010;55:2644 e50. <http://doi.org/dpp7qq>
- Report of Sir David Weatherall's working group. The use of non-human primates in research. 2006. 147 p.
- Collier J. Non-alcoholic fatty liver disease. *Medicine* 2006;35:86-8. <http://doi.org/c8wg9b>
- Su L, Zhang H, Zhao J, Zhang S, Zhang Y, Zhao B, et al. Safrole-20,30-oxide induces atherosclerotic plaque vulnerability in apolipoprotein E-knockout mice. *Toxicol Lett* 2013;217:129-36. <http://doi.org/rkn>
- Kressel G, Trunz B, Bub A, Hülsmann O, Wolters M, Lichtinghagen R, et al. Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk. *Atherosclerosis* 2009;202:263-71. <http://doi.org/bbv2hb>

19. Green D, Foiles N, Chan C, Schreiner PJ, Liu K. Elevated fibrinogen levels and subsequent subclinical atherosclerosis: the CARDIA Study. *Atherosclerosis* 2009;202:623-31. <http://doi.org/czfqrh>
20. Auclair S, Milenkovic D, Besson C, Chauvet S, Gueux E, Morand C, et al. Catechin reduces atherosclerotic lesion development in apo E-deficient mice: a transcriptomic study. *Atherosclerosis* 2009;204:e21-7. <http://doi.org/bsdxms>
21. Watson AM, Soro-Paavonen A, Sheehy K, Li J, Calkin AC, Koitka A, et al. Delayed intervention with AGE inhibitors attenuates the progression of diabetes-accelerated atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia* 2011;54:681-9. <http://doi.org/brpfw>
22. Xu Z, Azordegan N, Zhao Z, Le K, Othman RA, Moghadasian MH. Pro-atherogenic effects of probucol in apo E-KO mice may be mediated through alterations in immune system: Parallel alterations in gene expression in the aorta and liver. *Atherosclerosis* 2009;206:427-33. <http://doi.org/btjtk>
23. Iwata H, Aikawa M. Liver-artery interactions via the plasminogen-CD36 axis in macrophage foam cell formation: new evidence for the role of remote organ crosstalk in atherosclerosis. *Circulation* 2013;127:1173-6. <http://doi.org/rkp>