



# Avances en el estudio de la fisiología y patología endotelial en modelos animales

## Advances in the study of endothelial pathology and physiology in animal models

Fernando Iván Flores-Pérez\* Mario Pérez-Martínez\*\*

---

### Abstract

A review was carried out focused on the animal models that have been used to generate advances in the knowledge of the endothelium physiopathology field. Basic aspects are explained in relation to history, types of animal models, variety of traditional animal models and transgenic or knockout animals; as well as related aspects of animal welfare and bioethics concerning the use of laboratory animals in biomedical research.

**Key words: ENDOTHELIUM, ANIMAL MODELS, PHYSIOLOGY, PATHOLOGY.**

### Resumen

Se efectuó una revisión de los modelos animales a partir de los cuales se han logrado avances en el conocimiento de la fisiopatología endotelial. Se explican aspectos básicos desde la historia, tipos de modelos animales, modelos animales tradicionalmente usados y modelos animales manipulados genéticamente. Asimismo, se incluyen aspectos relacionados con la bioética y el trato humanitario de los animales empleados en la investigación biomédica.

**Palabras clave: ENDOTELIO, MODELOS ANIMALES, FISIOLOGÍA, PATOLOGÍA.**

---

Recibido el 12 de mayo de 2005 y aceptado el 15 de noviembre de 2005.

\*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campo Experimental de Desarrollo e Investigación Agropecuaria (CEDIA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 101, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

\*\*Departamento de Morfología, Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción, "Rosa Emilia Lavielle", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia y sobretiros: Mario Pérez-Martínez, Departamento de Morfología, Sección de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Correo electrónico: perezmtzmario@yahoo.com.mx

## Introduction

One cannot deny the advances that have been attained in medicine through the use of animal models for human health and by means of those it will be possible to cure diseases that have high economic costs and have caused great suffering to humanity. Nevertheless, in the use of experimental animals they deserve to be treated humanely and with respect, avoiding as much as possible unnecessary pain, topics that have a bioethical character.<sup>1,2</sup>

Within the enormous biological complexity of human beings, the study of vascular biology has become very important. Nevertheless, the knowledge that has been generated in order to understand the physiology and pathology of the endothelium would not have come about without the use of animal models.<sup>3</sup>

Animal models for biomedical research are considered to be those where physiology, behavior and spontaneous or induced pathological processes are similar to human or other species problems.<sup>4</sup>

The endothelium is a dynamic tissue, that besides being fundamental for vasodilatation control and vascular tone, it also modulates platelets' function, leukocyte adhesion to endothelial cells, smooth muscle-vascular cells proliferation and cellular migration by means of regulating molecules. One of these is nitric oxide, that is synthesized by means of nitric oxide synthase and it is important in vascular homeostasis maintenance.<sup>5</sup>

Nitric oxide (NO) is an endogenous vasodilator that seems to inhibit cellular increments of vascular muscle and extracellular matrix expansion associated with vascular remodeling in hypertension and formation of atherosclerotic lesions. Due to the above, today the study of the activity of nitric oxide on endothelium physiopathology is of great interest in biomedical research.<sup>5</sup>

Also, a considerable amount of the present knowledge of vascular endothelium physiology has been obtained from studies performed with primary culture of endothelial cells. Nevertheless, this methodology has its limitations and it has become necessary to generate endothelial cell lines derived from the umbilical vein, in order to serve as a model for the study of this tissue.<sup>12</sup> Recently, endothelial cell lines have been generated from the umbilical vein of bovines, that preserve vascular endothelium characteristics. With this model, it shall be possible *in vitro* to continue the study of the effect of the different factors that regulate angiogenesis.<sup>6</sup>

## Introducción

Los adelantos que se han logrado en la medicina mediante el uso de modelos animales para la salud humana son innegables e incluso por medio de ellos se logrará curar enfermedades que causan grandes costos económicos y sufrimiento a la humanidad. No obstante, en el uso de animales para la experimentación el respeto que éstos merecen a ser tratados de manera humanitaria, evitándoles al máximo posible el dolor innecesario, ha dado lugar a cuestionamientos de carácter bioético.<sup>1,2</sup>

Dentro de la enorme complejidad biológica del ser humano, el estudio de la biología vascular ha cobrado importancia. Sin embargo, el conocimiento que se ha generado con la finalidad de entender la fisiología y patología del endotelio no habría existido sin el empleo de modelos animales.<sup>3</sup>

Se entiende por modelo animal para la investigación biomédica, aquel mediante el cual se estudia la fisiología, comportamiento, procesos patológicos, espontáneos o inducidos, que presenten semejanza con los padecimientos humanos o de otras especies.<sup>4</sup>

El endotelio constituye un tejido dinámico, que además de ser fundamental en el control de la vasodilatación y del tono vascular, también modula la función plaquetaria, la adhesión de leucocitos a las células endoteliales, la proliferación de células de músculo liso-vascular y la migración celular por medio de moléculas reguladoras. Una de éstas es el óxido nítrico, que es sintetizado mediante la sintetasa de óxido nítrico endotelial y es importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular.<sup>5</sup>

El óxido nítrico (NO) representa un vasodilatador endógeno que parece inhibir los incrementos en la celularidad del músculo vascular y en la expansión de la matriz extracelular asociada con la remodelación vascular en la hipertensión y por la formación de lesiones ateroscleróticas. Como consecuencia de lo anterior, hoy día el estudio del desempeño del óxido nítrico en la fisiopatología del endotelio constituye un tema de gran interés en la investigación biomédica.<sup>5</sup>

Asimismo, buena parte del conocimiento actual de la fisiología del endotelio vascular se ha obtenido a partir de estudios efectuados en cultivos primarios de células endoteliales; sin embargo, esta metodología presenta limitaciones que han hecho necesaria la generación de líneas celulares endoteliales a partir de la vena umbilical, que pueden servir como modelo de estudio de este tejido.<sup>12</sup> Recientemente se han generado líneas celulares endoteliales de la vena umbilical de bovino, que conservan características de endotelio vascular, con este modelo *in vitro* se podrá

## **Study of endothelium in classical animal models**

### *Swine model*

The effect of chronic aerobic exercise on endothelium nitric oxide synthase (e-NOS) and oxidant/anti-oxidant enzymes balance of the aortic endothelium of swine has been studied in a miniature Yucatan adult swine model. In these studies, the conclusion was that aerobic exercise has an effect on both enzymes and reduces oxidative stress indexes in aortic endothelial cells, and this could contribute to improve the endothelial function.<sup>7</sup>

Modulating function of estrogens on e-NOS have also been studied in the swine model, in order to prove that estrogens have an important impact on atherosclerosis physiopathology. In a study performed on hypercholesterolemic pigs, it was reported that long term estradiol administration maintains a relaxation that is endothelium dependant

Bilateral angiographies applied to young farm pigs, and later with the aid of infiltration catheters, it was possible to transfer, by means of a vector, the nitric oxide synthase gene. Based on the experimental evidences that were obtained, it was proposed that this enzyme participates in the vascular repair process after damage has been sustained; therefore, the transference of this gene should be useful in the prevention of vascular restenosis after a percutaneous coronary intervention.

On the other hand, pigs have been used as a potentially useful model in the study of dyslipidemia associated with diabetes in humans, due to the fact that transport of a large cholesterol fraction in low density lipoproteins (LDL), is similar to what happens in humans.<sup>8</sup>

In miniature male pigs, insulin synthesizing pancreas cells have been destroyed to study diabetes. These animals were subjected to a high fat and cholesterol diet; when compared to non-diabetic animals, it was observed that the diabetic pigs had several early signs of severe vascular damage. In this study, it was concluded that the pig is a good model for the study of human dyslipidemias and that it permits the study of coronary arterial and peripheral vascular disease in diabetic patients.<sup>8</sup>

Today atherosclerosis is a high prevalence disease, its thrombotic complications cause a great number of deaths and incapacity; therefore; it is useful to have animal models where this human disease can be reproduced experimentally from its early stages.<sup>9</sup>

Knowledge has been increased in animal models on the role of platelets, lipids, renin-angiotensin system, cytokines, and growth factors in the pathogenesis

continuar el estudio del efecto de los factores que regulan la angiogénesis.<sup>6</sup>

## **Estudio del endotelio en modelos animales clásicos**

### *El modelo del cerdo*

En un modelo de cerdas miniatura Yucatán, adultas, se ha estudiado el efecto del ejercicio aeróbico crónico sobre los niveles de la óxido-nítrico sintetasa endotelial (e-NOS) y el balance de las enzimas oxidantes/antioxidantes en el endotelio aórtico porcino. En estos estudios se concluyó que el ejercicio aeróbico influye sobre ambas enzimas y disminuye los índices de estrés oxidativo en células endoteliales aórticas, ello puede contribuir a mejorar la función endotelial.<sup>7</sup>

En el modelo porcino también se ha estudiado la función moduladora de los estrógenos sobre la e-NOS, con el fin de probar que los estrógenos tienen impacto importante en la fisiopatología de la aterosclerosis. En un estudio efectuado en cerdos hipercolesterolémicos se informó que la administración de estradiol en el largo plazo mantiene la relajación dependiente de endotelio.

Por medio de angiografía bilateral practicada en cerdos jóvenes de granja y, posteriormente, con ayuda de catéteres de infiltración, se logró transferir el gen para la óxido-nítrico sintetasa inducible mediante un vector. Con base en las evidencias experimentales obtenidas, se propuso que esta enzima participa en el proceso de reparación vascular posterior a un daño, por lo que la transferencia de este gen será útil en la prevención de la restenosis vascular posterior a la intervención coronaria percutánea.

Por otra parte, se ha utilizado al cerdo como un modelo potencialmente útil para el estudio de las dislipidemias asociadas con la diabetes en humanos, debido a que el transporte de una fracción grande de colesterol total en lipoproteínas de baja densidad (LDL), es similar en los humanos.<sup>8</sup>

En cerdos miniatura, macho, se han destruido las células que sintetizan insulina del páncreas, con la finalidad de estudiar la diabetes. A estos animales se les ha sometido a dieta alta en grasa y en colesterol; al comparárseles con animales no diabéticos, se observó que los cerdos diabéticos presentaban diversos signos tempranos de daño vascular severo. En este estudio se concluyó que el cerdo constituye un buen modelo para el estudio de las dislipidemias que aquejan al humano y permite el estudio de la enfermedad arterial coronaria y vascular periférica en pacientes diabéticos.<sup>8</sup>

Hoy la aterosclerosis es enfermedad de alta prevalencia, sus complicaciones tromboticas propician

of diverse alterations of the endothelium physiology, with the objective to propose better therapeutic strategies.<sup>10</sup>

In studies performed in the swine model, anti-platelet agents have been found that have a beneficial effect on the prevention of formation and development of atherosclerotic coronary lesions in humans.<sup>11</sup>

In relation to the study on the effect of vitamins on endothelium dysfunction caused by hypercholesterolemia, the most common hypothesis on the origin of atherosclerosis establishes that the endothelial damage is the beginning of the alterations that shall promote it. The hypercholesterolemic swine model has a great similitude with the respective human physiology; therefore, it has been used to evaluate the effect of certain antioxidants as a treatment to inhibit or significantly decelerate such a pathology in order to normalize endothelial function. The results that were obtained in certain epidemiological and experimental studies suggest that an increase in plasma concentrations of vitamin E and the daily consumption of  $\beta$ -carotenes or vitamin C may reduce the incidence of atherosclerosis.<sup>12</sup>

On the other hand, the potential use of genetically modified pigs, as organ donors for humans, represents an important therapeutic alternative. With this purpose, transgenic animals have been obtained where complement cascade activation has been inhibited to avoid immunological tissue rejection.<sup>13</sup>

### *Rodent model*

In the rodent models, estrogen impact on vascular damage response has also been evaluated. In studies performed in rats, it has been reported that estradiol (E2) attenuates media and intima hypertrophy of the carotid artery in females, but not in males and an additional treatment with medroxyprogesterone acetate blocks the protector effect of estrogens. Also, estrogens improve endothelial recovery after vascular damage, that is manifested in more re-endothelization and endothelium dependant relaxation in previously damaged arterial segments.<sup>14-15</sup> Higher capacity for recuperation was associated in these studies with an increase in nitric oxide synthesis capacity.<sup>16</sup>

Mouse models have also been used to study carotid artery lesions, since it was found that physiological E2 inhibits the increase in smooth muscle cells as well as vascular media layer proliferation.

On the other hand, the rat model served to evaluate the effect of experimentally induced damage to the spinal cord, on the activity of nitric oxide synthase (NOS). In this study a transitory increment was observed in NOS activity that is reflected in the endothelium and the media layer of atrial intramural

gran número de muertes y discapacidades, por ello resulta de utilidad disponer de modelos animales en los que se reproduzca experimentalmente la enfermedad que aqueja a los humanos en sus etapas tempranas.<sup>9</sup>

En los modelos animales también se ha profundizado en el conocimiento sobre el papel de las plaquetas, de los lípidos, del sistema renina-angiotensina, de las citocinas y de los factores de crecimiento en la patogenia de diversas alteraciones de la fisiología endotelial con el fin de proponer mejores estrategias terapéuticas.<sup>10</sup>

En estudios realizados en el modelo porcino se ha encontrado que los agentes antiplaquetarios tienen un efecto benéfico en la prevención de la formación y desarrollo de lesiones ateroscleróticas coronarias en humanos.<sup>11</sup>

Respecto del estudio del efecto de las vitaminas en la disfunción endotelial inducida por hipercolesterolemia, la hipótesis más común sobre el origen de la aterosclerosis plantea que el daño endotelial es el inicio de las alteraciones que la propiciarán. El modelo del cerdo hipercolesterolémico presenta gran similitud con el humano en la fisiopatología de aquella, por ello se ha utilizado para evaluar el efecto de algunos antioxidantes como tratamiento para inhibir o frenar significativamente esta patología, con el fin de normalizar la función endotelial. Los resultados obtenidos de algunos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que el aumento en las concentraciones plasmáticas de vitamina E y la ingesta diaria de  $\beta$ -carotenes o de vitamina C pueden reducir la incidencia de la aterosclerosis.<sup>12</sup>

Por otra parte, el uso potencial de cerdos genéticamente modificados, como donadores de órganos para ser transplantados en humanos, representa una importante alternativa terapéutica. Con este fin se han obtenido animales transgénicos en los que se ha inhibido la activación de la cascada del complemento para evitar el rechazo inmunológico de los tejidos.<sup>13</sup>

### *El modelo de roedores*

En el modelo de roedores también se ha evaluado el impacto de los estrógenos en la respuesta al daño vascular. En estudios desarrollados en ratas se ha informado que el estradiol (E2) atenúa la hipertrofia media e íntima de la arteria carótida en hembras, pero no en machos, y el tratamiento adicional con acetato de medroxyprogesterona bloquea el efecto protector de los estrógenos. Asimismo, los estrógenos mejoraron la recuperación endotelial posterior al daño vascular, lo que se manifiesta en mayores re-endothelización y relajación dependiente de endotelio en segmentos

arteries; therefore, NOS activity was transiently elevated in intramural atrial arteries of rats subjected to experimental damage.<sup>17</sup>

As a consequence of studies done in mice models it is known that endothelial cells participate actively in lymphocyte migration from the blood to the lymph nodes or towards mucous tissues of the organism. Communication with endothelial cells is necessary for lymphocyte transit. As a consequence of physical damage to the endothelium or a state of hypoxia, heparin-sulfate synthesis is reduced. These molecules have anti-coagulant functions, they participate in endothelium integrity maintenance, regulate lipid metabolism in the endothelium and favor the superoxide-dismutase union to the endothelial cell membrane.<sup>18</sup>

Studies have been performed *in vivo* on atherosclerotic animal models to determine the participation of the adhesion molecules and the endothelium-monocytes interaction that is mediated by these compounds in the formation of atherosclerotic lesions by the use of blocking antibodies or knockout mice for adhesion molecules. Adhesion molecules that are relevant in atherogenesis are: selectin P, selectin E, membrane glycoproteins –that are called intercellular adhesion molecules (ICAM-1)– and vascular cells adhesion molecules (VECAM), CD18 and VLA-4 molecules, among others. The studies that are useful to know the participation of these molecules in atherogenesis pathogeny are based mainly upon mice models, most of which are subjected to high fat and cholesterol diets. These studies indicate that P-selectin, PSG-1, VLA-4 and VCAM-1 are the most important adhesion molecules, since they are responsible for recruiting monocytes to the atherosclerotic lesions.<sup>23</sup> Available information based on these models indicates that the adhesion molecules are extremely important to the initiation and development of the atherosclerotic disease.<sup>19</sup>

It has been proposed that the immunological system participates during atherosclerosis development. In order to evaluate this concept, some immunocompetent system cells have been studied in a murine model for atherosclerosis, that consists of mice that lack apolipoprotein E. From this model, genetically hypercholesterolemic it has been suggested that T CD4+ cells participate in the formation of atherosclerotic lesions.<sup>20-21</sup>

On the other hand, apolipoprotein E deficient male mice were used to study the role of B and T cells in lipoprotein metabolism and it was reported that both cells and their products influence the development of atherosclerosis in different vascular sites and it is not known exactly if these differences are

arteriales previamente dañados.<sup>14-15</sup> En estos estudios la mayor recuperación estuvo asociada con un incremento en la capacidad de síntesis de óxido nítrico.<sup>16</sup>

También se ha utilizado el modelo de ratón para el estudio de la lesión de la arteria carótida, pues se halló que los niveles fisiológicos de E2 inhiben el incremento en la proliferación de las células de músculo liso y en la capa media vascular.

Por otra parte, en el modelo de rata se evaluó el efecto que tiene un daño inducido experimentalmente a la médula espinal, sobre la actividad de la óxido-nítrico sintetasa (NOS). En este estudio se observó un incremento transitorio en la actividad de la NOS, que se refleja en el endotelio y en la capa media de las arterias intramurales atriales, por lo que la actividad de la NOS se elevó transitoriamente en las arterias intramurales atriales de ratas sometidas a un daño experimental.<sup>17</sup>

Como consecuencia de los estudios efectuados en el modelo del ratón, actualmente se sabe que las células endoteliales participan activamente en la migración de los linfocitos de la sangre a los linfonodos o para poblar las mucosas del organismo. Para el tránsito de los linfocitos es necesaria su comunicación con las células endoteliales. Como consecuencia de un daño físico al endotelio o de un estado de hipoxia, disminuye la síntesis de los heparín-sulfato. Estas moléculas tienen funciones anticoagulantes, participan en el mantenimiento de la integridad del endotelio, regulan el metabolismo de los lípidos del endotelio y favorecen la unión de la superóxido-dismutasa a la membrana de las células endoteliales.<sup>18</sup>

Para determinar la participación de las moléculas de adhesión y la interacción monocito-endotelial mediada por estos compuestos en la formación de lesiones ateroscleróticas, se han realizado estudios de las lesiones *in vivo* en modelos animales ateroscleróticos mediante anticuerpos bloqueadores o ratones knockout a moléculas de adhesión. Dentro de las moléculas de adhesión relevantes en la aterogénesis se citan: selectina P, selectina E, glucoproteínas de membrana –denominadas moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1)– y moléculas de adhesión de células vasculares (VECAM), la molécula CD18 y VLA-4, entre otras. Los estudios útiles para conocer la participación de estas moléculas en la patogenia de la aterogénesis se basan principalmente en modelos de ratones, sometidos en la mayoría de los casos a dietas altas en grasas y colesterol. Estos estudios indican que la P-selectina, PSG-1, VLA-4 y VCAM-1 son las moléculas de adhesión más importantes, ya que son responsables de reclutar monocitos en las lesiones ateroscleróticas.<sup>23</sup> La información disponible basada en estos modelos indica que las moléculas de adhesión



due to direct influence by arterial wall cells or their effect on plasma lipids.<sup>22</sup>

### *Rabbit model*

The effect of shock wave therapy on neovascularization in the union of bone-Achilles tendon has been studied in the rabbit model. This technique is useful in the treatment of certain orthopedic conditions, such as the lack of bone fracture union in long bones. Experimentally, it has been shown that it induces neovascularization development associated with early release of angiogenesis markers and improves blood supply and tissue regeneration.<sup>23</sup>

Also, ethinyl-estradiol was found in rabbits fed with high cholesterol diets and horse conjugated estrogens reduced atherosclerosis by 35% in the aortic arch and 75%-80% in abdominal and thoracic aorta.<sup>24</sup>

### *Dog model*

The dog model has been used in the study of vascular changes induced by cerebral vasospasm. In this model, the temporal course of apoptosis in endothelial cells of spastic brain arteries has been studied after experimentally inducing a subarachnoid hemorrhage. This suggests that apoptosis is important in vasospasm pathogenesis.<sup>20</sup> Prolonged contraction of vessels has the tendency of generating a state of ischemia or infarcts, and this is accompanied by extensive necrosis of smooth muscle cells and dystrophy of endothelial cells, propitiating the loss of endothelium.<sup>25</sup>

### ***Study of endothelium in genetically altered animals***

From 1980 on, the necessary technology has existed to obtain transgenic animals and these have been used as models in the study of endothelium. Indubitably, the mouse is the most used model.

Genetically altered animals permit the overexpression or lack of certain specific genic product; these are known as transgenic animals and knockout animals, respectively. In this manner, both models establish the functionality of a specific gene, in the context of a complete live organism.

### *Transgenesis*

This constitutes a methodology that allows the modification of the mammal genome in a stable manner, in such a way that these modifications shall be transmitted through the germinal line. Up until now, this experimental procedure has been performed in goats, pigs, cows and especially in biomedical research

son de gran importancia en el inicio y desarrollo de la enfermedad aterosclerótica.<sup>19</sup>

En el desarrollo de la aterosclerosis se ha propuesto la participación del sistema inmunológico. Con el fin de evaluar lo anterior, se han estudiado algunas células del sistema inmunocompetente en un modelo murino para la aterosclerosis, consistente en ratones carentes en la apolipoproteína E. A partir de este modelo genéticamente hipercolesterolémico se ha sugerido que las células T CD4+ participan en la formación de lesiones ateroscleróticas.<sup>20-21</sup>

Por otra parte, en ratones macho deficientes en apolipoproteína E, se estudió el papel de las células B y T en el metabolismo de lipoproteínas y se informó que ambas células y sus productos influyen en el desarrollo de aterosclerosis en sitios vasculares diferentes, y no se sabe con exactitud si estas diferencias se deben a la influencia directa de las células en la pared arterial o a su efecto en los lípidos plasmáticos.<sup>22</sup>

### *El modelo del conejo*

En el modelo del conejo se ha estudiado el efecto de la terapia de onda de choque sobre el proceso de neovascularización en la unión hueso-tendón de Aquiles; esta técnica es útil en el tratamiento de algunas condiciones ortopédicas, como la falta de unión de fracturas de huesos largos; experimentalmente se sabe que induce desarrollo de neovascularización asociado con liberación temprana de marcadores relacionados con la angiogénesis, y mejora el aporte sanguíneo y la regeneración tisular.<sup>23</sup>

Asimismo, en conejos alimentados con dietas altas en colesterol se halló que el etinil-estradiol y los estrógenos de equino conjugados redujeron la aterosclerosis en 35% en el arco aórtico y en 75%-80% en la aorta abdominal y torácica.<sup>24</sup>

### *El modelo del perro*

Para estudiar los cambios vasculares inducidos por el vasoespasmo cerebral se ha utilizado el modelo del perro, en éste se ha evaluado el curso temporal de la apoptosis en células endoteliales de arterias cerebrales espásticas después de inducir hemorragia subaracnoidea experimental. Aquí se muestra que las células endoteliales que están bajo estas condiciones, presentan cambios semejantes a la apoptosis, ello sugiere que la apoptosis es importante en la patogénesis del vasoespasmo.<sup>20</sup> La contracción prolongada de los vasos tiende a generar un estado de isquemia o infarto, cuadro que se acompaña de necrosis extensiva de células del músculo liso y de distrofia de células endoteliales, ello propicia pérdida de endotelio.<sup>25</sup>

in mice, rats and rabbits.<sup>27</sup> This technique consists of DNA injection in fertilized embryos. The DNA is then introduced randomly in the rest of the genome and numerous copies are inserted in it. Up until now, it hasn't been possible to establish either the number of copies, or the place of insertion. In theory, the expression of the transgenes is imposed on the expression of endogenous genes.<sup>27</sup>

To attain the expected phenotype due to the overexpression of the transgene it must behave as a dominant gene; besides, it is necessary to consider that the position of the transgene may affect the other genes and cause mutations. Also, its position in the context of a chromosome may affect its expression.<sup>27</sup> Final results of this alteration shall be the overexpression of the gene and the carrier of this gene shall be called transgenic animal.<sup>27</sup> The transgenesis techniques, by the use of specific promoters, have allowed the expression of the transgene to be limited to a target organ, or that its expression is carried out only under certain conditions such as antibiotic administration. Another important part are the crosses between transgenic animals that allow the creation of double transgenic animals, with phenotypes that are useful for experimental methodologies.

### ***Knockout animals***

This methodology consists of endogenous DNA replacement in a specific previously mutated DNA point, using homologous recombination to insert the DNA in specific regions of these genes, favoring the inactivation of the genic product. In this manner, animals that do not have the genic product or that have a mutation are obtained. Their usefulness is directed to the knowledge of a gene, whether it possesses or not a critical function. The knockout technology has several advantages over transgenesis due to the fact that the site, as well as the number of copies of it, are known and established. In this case, the genes are expressed under the endogenous promoter control; therefore, the expression levels are similar to the ones observed physiologically, and this permits a more precise study of the target gene.<sup>30</sup> By these genetic manipulation methods cardiac and endothelial physiology knowledge has advanced quite a bit.<sup>28-30</sup>

### ***Transgenic animal models used in endothelium study***

#### ***Endothelium nitric oxide synthase (e-NOS)***

In relation to transgenic mice for e-NOS, there is a transgenic mouse capable of expressing bovine e-NOS.<sup>31</sup> Such an animal expresses that protein

### ***Estudio del endotelio en animales manipulados genéticamente***

A partir de que se tuvo la tecnología necesaria para obtener animales transgénicos en 1980, éstos se han utilizado como modelos para el estudio del endotelio. Indudablemente el modelo animal más utilizado es el ratón.<sup>26</sup>

Los animales manipulados genéticamente permiten la sobreexpresión de un producto génico determinado o su no expresión; se les conoce como animales transgénicos y knockout, respectivamente. Así, ambos modelos establecen la funcionalidad de un gen en particular, en el contexto de un organismo vivo completo.

### ***Transgénesis***

Ésta constituye una metodología que permite modificar el genoma de los mamíferos de manera estable, por lo que estas modificaciones serán transmitidas a través de la línea germinal. Hasta el momento este procedimiento experimental se ha efectuado en la cabra, el cerdo, la vaca y, especialmente en la investigación biomédica, se ha practicado en ratones, ratas y conejos.<sup>27</sup> Esta técnica consiste en la inyección de ADN en el embrión fertilizado. El ADN se introduce de manera azarosa en el resto del genoma y numerosas copias se insertan en él. Hasta la fecha no ha sido posible manipular ni el número de copias ni el lugar de la inserción, por lo que, en teoría, la expresión de los transgenes se impone sobre la expresión de genes endógenos.<sup>27</sup>

Para que se logre el fenotipo esperado por la sobreexpresión del transgene, éste debe comportarse como dominante; además, es necesario considerar que el efecto posicional del transgene puede afectar a los demás genes y provocar mutaciones. Asimismo, su posición en el contexto de un cromosoma afectará su expresión.<sup>27</sup> El resultado final de esta manipulación será la sobreexpresión del gen, y al portador de este transgene se le denominará animal transgénico.<sup>27</sup> Las técnicas de transgénesis, mediante el uso de promotores específicos, han permitido que la expresión del transgene se limite a un órgano de interés, o que su expresión sea sólo bajo ciertas condiciones, como la administración de un antibiótico. Otra parte importante son las cruces que se llevan a cabo entre animales transgénicos que permiten la creación de dobles transgénicos, con fenotipos útiles para efectuar metodologías experimentales.

### ***Animales knockout***

Esta metodología consiste en remplazar el ADN

in heart, lungs, aorta and uterus, but with lower expression levels in brain and liver; these animals have a hypotension phenotype.<sup>32</sup>

There is a transgenic animal that expresses human e-NOS joined with a fluorescent protein; also, there are evidences in the sense that the expressed e-NOS enzyme is functional and its expression is found in certain organs such as heart, liver, kidneys and adrenal glands.<sup>33</sup>

Hypotension without an increase in urine volume nor cardiac frequency has been documented in transgenic mice that overexpress the endothelial nitric oxide synthase. A relevant finding was reported in the study where this transgenic animal is described, that consists in the reduction of the effect of vasodilators that depend on nitric oxide; nevertheless, the relaxation that depends on cAMP remains unaltered.<sup>33</sup>

### *Transgenic mice for endothelin 1*

Human origin endothelin 1 transgene is expressed in brain, lungs and kidneys; in these last ones, alterations such as interstitial fibrosis, cystitis and glomerulosclerosis are found;<sup>34</sup> nevertheless, the individuals have normal blood pressure, perhaps due to the fact that other chemical mediators, as nitric acid, work as antagonists of the endothelin 1 vascular activity.<sup>35</sup>

### *Angiotensin*

There are also transgenic mice and rats that are capable of overexpressing human, rats and mice origin angiotensinogen gene, with the promoter of the gene or the murine promoter of metallothionein.<sup>32</sup> Transgenic rodent models do not present pressure alterations; therefore, they are normotensive, even though they have high plasma concentrations of human angiotensinogen. With these observations it has been confirmed that human angiotensinogen does not have activity in rodents.<sup>35</sup> When transgenic rats or mice that overexpress human angiotensinogen are crossed with those that overexpress human origin rennin, there is an excess of angiotensin II and they develop hypertension.<sup>32</sup>

There are references to the existence of a transgenic mouse that has the angiotensinogen gene of rat and has the particularity of being hypertensive; this could be due to the different promoters that have been used to obtain the animal models, that would cause difference in the gene expression in different tissues, as well as a variation in the integration of the transgene within the receptor genome, since this could integrate or remain ectopic.<sup>32</sup>

endógeno en un punto previamente definido con ADN mutado, valiéndose de la recombinación homóloga para insertar el ADN en regiones específicas de estos genes, ello propicia inactivación del producto génico; se obtienen así animales que carecen del producto génico o que poseen mutación. Su utilidad está enfocada en determinar si un gen posee una función crítica. La tecnología knockout presenta diversas ventajas sobre la transgénesis debido a que el sitio, así como el número de copias de éste, son conocidos y determinados. En este caso, los genes se expresan bajo el control del promotor endógeno, por lo que los niveles de expresión se asemejan a los observados fisiológicamente, ello permite un estudio más certero del gen de interés.<sup>30</sup> Mediante estos métodos de manipulación genética, se ha avanzado en el conocimiento de la fisiología cardiaca y endotelial.<sup>28-30</sup>

### **Modelos animales transgénicos empleados en el estudio del endotelio**

#### *Óxido nítrico-sintetasa endotelial (e-NOS)*

Respecto de los ratones transgénicos para e-NOS, existe un ratón transgénico capaz de expresar la e-nos perteneciente al bovino.<sup>31</sup> Tal animal expresa dicha proteína en corazón, pulmones, aorta y útero, pero con niveles de expresión más bajos en cerebro y en hígado; estos animales exhiben un fenotipo de hipotensión.<sup>32</sup>

Existe un animal transgénico que expresa la e-NOS de origen humano acoplada a una proteína fluorescente; asimismo, se aportan evidencias en el sentido de que la enzima e-NOS expresada es funcional y que su expresión se encuentra en algunos órganos, como corazón, hígado, riñones, adrenales.<sup>33</sup>

En el ratón transgénico que sobreexpresa a la óxido-nítrico sintetasa endotelial, se ha documentado presencia de hipotensión sin incremento en el volumen de orina ni de frecuencia cardiaca. En el estudio en el que se describe este animal transgénico se refiere un hallazgo relevante que consiste en disminución en el efecto de vasodilatadores dependientes de óxido nítrico; sin embargo, la relajación dependiente de cAMP permanece sin alteraciones.<sup>33</sup>

#### *Ratones transgénicos para endotelina 1*

El transgene endotelina 1 de origen humano se expresa en cerebro, pulmón y riñones; en estos últimos se presentan alteraciones, como fibrosis intersticial, cistitis y glomeruloesclerosis;<sup>34</sup> sin embargo, los



## *Rennin*

Transgenic mice and rats have been produced that overexpress the rennin gene of different species such as rats, mice and humans.<sup>36</sup>

Also, double transgenic mice have been obtained that express the Ren-1 and Ren-2 genes. Arterial pressure has been found to be normal in transgenic mice that have the rennin gene of the rat with the mMT-1 promoter, when this mouse is crossed with the angiotensinogen transgenic it develops hypertension. These models that contain rennin and angiotensin human genes are useful for the study of angiotensin production and action in tissues, as well as to prove the effect of rennin inhibitor. This cannot be carried out in rodents that are not genetically altered due to species specificity of rennin and angiotensinogen.<sup>32</sup>

On the other hand, there is a transgenic rat for the murine rennin gene (Ren-2), this type of animals develop hypertension and cardiovascular hypertrophy even though there are low circulating concentrations of angiotensin II.

## *Angiotensin receptor*

There has been a report of a transgenic mouse that overexpresses the AT-1 receptor in heart. The phenotype of these animals differs from transgenic rats.<sup>36</sup>

In transgenic mice the overexpression of the AT-2 receptor in cardiac tissue has been achieved; they do not have morphological alterations, but they are less sensitive to high blood pressure induction by angiotensin II.<sup>32</sup>

## *Interleukin-10 (IL-10)*

There are also mice that overexpress the human gene that codifies for IL-10<sup>37</sup> in them it was determined that IL-10 was overexpressed by their lymphocytes. Also, it has been reported that the animals show a normal T and B lymphocyte development, and that anti-tumoral activity is reduced in this IL-10 transgenic mouse.<sup>37</sup>

## *Apolipoproteins in transgenic rabbits*

Diverse characteristics of the rabbit model make it an excellent specimen for the study of factors that affect endothelium physiology.

In this species apolipoprotein apo B is similar to human protein in its chemical composition and apoprotein content. Rabbit livers lack apo B RNAm edition mechanisms, as it happens in humans that produce apo B-100, that contains low density lipoproteins.<sup>38</sup>

individuos presentan presión sanguínea normal, debido, quizá, a que otros mediadores químicos, como el ácido nítrico, son antagónicos a la actividad vascular de la endotelina 1.<sup>35</sup>

## *Angiotensina*

También existen ratones y ratas transgénicos capaces de sobreexpresar el gen del angiotensinógeno de origen humano, de ratas y ratones, con el promotor del gen o el promotor murino de metalotioneína.<sup>32</sup> Los modelos de roedores transgénicos no presentan alteraciones en su presión, por lo que son normotensos, a pesar de que algunos presentan altas concentraciones plasmáticas del angiotensinógeno humano. Con estas observaciones se ha confirmado que el angiotensinógeno humano no posee actividad en los roedores.<sup>35</sup> Cuando ratas o ratones transgénicos que sobreexpresan el angiotensinógeno humano son cruzados con los que sobreexpresan la renina de origen humana, presentan un exceso de angiotensina II y desarrollan hipertensión.<sup>32</sup>

Se ha referido la existencia de un ratón transgénico que posee el gen del angiotensinógeno de rata y presenta la particularidad de ser hipertenso; ello puede deberse a los distintos promotores que se han usado para la obtención de los modelos animales, lo que provocaría diferencias en la expresión del gen en los diversos tejidos, así como variación en la integración del transgene dentro del genoma receptor, ya que éste podría integrarse o permanecer de manera ectópica.<sup>32</sup>

## *Renina*

Se han producido ratones y ratas transgénicas que sobreexpresan el gen de la renina de distintas especies, como la rata, el ratón y el humano.<sup>36</sup>

Asimismo, se han obtenido ratones que son doblemente transgénicos y que expresan los genes Ren-1 y Ren-2. Se ha referido que la presión arterial de los ratones transgénicos que poseen el gen de la renina de la rata con el promotor de la mMT-1 es normal, cuando este ratón es cruzado con el transgénico de angiotensinógeno desarrolla hipertensión. Estos modelos que contienen los genes humanos de renina y angiotensina son de utilidad para el estudio de la producción y acción de la angiotensina en los tejidos, así como para probar el efecto de inhibidores de renina, lo anterior no puede llevarse a cabo en roedores no manipulados genéticamente por la especificidad de especie que poseen la renina y el angiotensinógeno.<sup>32</sup>

Por otra parte, existe una rata transgénica para el gen murino de la renina (Ren-2), este tipo de animales

In relation to apolipoprotein A-1, a transgenic rabbit has been reported that contains human cDNA that codifies apo- A-1 protein, and another rabbit has the capacity to express that human protein in liver.<sup>38</sup>

In general, when the transgenic rabbits for this protein are administered high cholesterol diets, they develop atherosclerosis.<sup>38</sup> Also other rabbit based transgenic models have been developed such as apolipoprotein A, apolipoprotein B-100, apolipoprotein E3, where the highest expression is restricted to the liver. Atherosclerosis develops in the case of the transgenic rabbit for apolipoprotein E2.<sup>38</sup>

### *Erythropoietin*

At this time there is a mouse that overexpresses human origin erythropoietin whose promotor stimulates the overexpression of the transgene in nerve cells. In this model an almost double increase in hematocrit, hemoglobin and erythrocytes values were reported when compared to the wild type; these determinations were effectuated in a range of three to six months of age. Also, there were no alterations in heart rate nor systolic blood pressure.<sup>39</sup>

No signs of thromboembolism or cardiac infarction were observed in histological sections obtained from transgenic cardiac tissue.<sup>39</sup>

### *Amyloid precursor protein*

It has been reported that this mouse has a focal cerebral ischemia increase, modifications in behavior and gliosis; nevertheless, amyloid deposits have not been found in brain or blood vessels.<sup>40</sup> It has been used as a model for the study of Alzheimer disease.<sup>41</sup>

### *CuZn-SOD (superoxide-dismutase)*

There is a mouse that overexpresses the human gene that codifies for superoxide-dismutase. It was created in order to understand the importance of superoxide radicals in cerebral ischemia pathogenesis. In this model, there were no differences in arterial blood pressure. It was observed that experimentally induced ischemia in the brain were smaller in diameter in the transgenic mouse in relation with non-transgenic mice, and the amount of water in the edema was significantly lower.<sup>42</sup> This animal model has been used in the study of vasospasm.<sup>43</sup>

### *Parathyroid hormone related protein*

Through a transgenic mouse design, capable of expressing parathyroid hormone and its receptor, it was demonstrated that it has a vasodilatation function.

desarrollan hipertensión e hipertrofia cardiovascular, aun a pesar de tener concentraciones bajas de angiotensina II en la circulación.

### *Receptor de angiotensina*

Se ha notificado un ratón transgénico que sobreexpresa el receptor AT-1 en el corazón, el fenotipo de estos animales difiere del fenotipo de ratas transgénicas.<sup>36</sup>

En ratones transgénicos se ha logrado sobreexpresión del receptor AT2 en tejido cardiaco; aquéllos no presentan alteraciones morfológicas, pero son menos sensibles a la inducción de la presión sanguínea elevada por la angiotensina II.<sup>32</sup>

### *Interleucina-10 (IL-10)*

También existen ratones que sobreexpresan el gen humano que codifica para IL-10<sup>37</sup> en ellos se comprobó que sus linfocitos sobreexpresaban a la IL-10. Asimismo, se refiere que los animales presentan desarrollo normal de sus linfocitos T y B, también se observó que la actividad antitumoral se reduce en este ratón transgénico de IL-10<sup>37</sup>

### *Apolipoproteínas en conejos transgénicos*

Diversas características hacen del modelo del conejo un excelente ejemplar para el estudio de factores que afectan la fisiología del endotelio

En esta especie la apolipoproteína apo B es similar a la proteína de humanos en su composición química y en su contenido de apoproteína. El hígado del conejo carece de mecanismos de edición del RNAm de apo B, como ocurre en el humano que produce apo B-100, la cual contiene lipoproteínas de baja densidad.<sup>38</sup>

Respecto de la apolipoproteína A-1 se refiere la existencia de un conejo transgénico que contiene cADN de humano que codifica para la proteína apo-A-1, también se informa la existencia de un conejo transgénico que posee la particularidad de expresar dicha proteína humana en el hígado.<sup>38</sup>

En términos generales, cuando a los conejos transgénicos de esta proteína se les administran dietas altas en colesterol, desarrollan aterosclerosis.<sup>38</sup> También se han desarrollado otros modelos transgénicos con base en el conejo, como apolipoproteína A, apolipoproteína B-100, apolipoproteína E3, en las cuales la expresión más considerable está restringida al hígado. En el caso del conejo transgénico de apolipoproteína E2, se desarrolló la aterosclerosis.<sup>38</sup>

These animals died at 9.5 days of embryo development and manifested cardiac abnormalities, together with a reduction of blood pressure.<sup>44</sup>

In the transgenic model for the protein receptor, it was observed that mice develop normally and do not have alterations in any organ, even though an increase in the weight of the stomach has been reported. These observations are contrasting with those obtained in transgenic mice for the parathyroid hormone related protein, since in them bone and heart abnormalities occur.

In Table 1, is a summary of the information that is presented, in relation to the transgenic animals that are used in endothelium studies.

### **Knockout animals for endothelium studies**

#### *Endothelial Nitric Oxide Synthetase (e-NOS)*

Nitric oxide is considered a vascular homeostasis regulator, potent vasodilator useful in the regulation of arterial pressure, and it also inhibits coagulation through the inhibition of platelet adhesion.<sup>45</sup>

The gene that codifies for nitric oxide synthetase has diverse isoforms: i-NOS (lymphocytes and macrophages), n-NOS (nerve tissue) and e-NOS (endothelium).<sup>46</sup>

In relation to animal models used in the study of nitric oxide synthetase and its isoforms, the ideal model is the genetically modified mice (transgenic and knockout). Here we shall only deal with the e-NOS isoform, since it is expressed in the vascular endothelium and it is relevant in the regulation of vascular tone and tissue perfusion.<sup>47</sup>

Since 1995, knockout animals for this enzyme have been produced. They were developed to elucidate the function of e-NOS in hypertension. The mice have hypertension; therefore, it is proposed that the derived nitric oxide regulates blood pressure.<sup>48</sup> Hypertension phenotype was confirmed a year later by Shesely *et al.*<sup>49</sup> In these mice also low weight and gait problems occur when they reach 14 weeks. In later studies, other characteristics were observed such as behavior modifications, cardiac valves abnormalities and insulin resistance. It has been observed that most of these knockout animals die after birth, due to cardiac alterations that do not allow their survival and they have high sensitivity to contractile action induced by  $\beta$ -adrenergic agonists.<sup>47</sup>

From these studies it has been proposed that e-NOS is implicated not only in blood pressure regulation but also in lipids, glucose and angiogenesis homeostasis.<sup>50</sup>

Up until now, double knockout animals have been attained, for e-NOS as well as for apolipoprotein

### *Eritropoyetina*

Actualmente se cuenta con un ratón que sobreexpresa la eritropoyetina de origen humano y cuyo promotor promueve la sobreexpresión del transgene en células nerviosas. En este modelo se informó un incremento de casi el doble en valores de hematócrito, hemoglobina y eritrocitos, al compararse con el tipo silvestre; estas determinaciones se efectuaron en un rango de edad de entre tres y seis meses. Asimismo, no se encontraron alteraciones en la frecuencia cardíaca ni en la presión sanguínea sistólica.<sup>39</sup>

En secciones histológicas obtenidas a partir de tejido cardíaco transgénico, no se observaron signos de tromboembolismo o infarto al miocardio.<sup>39</sup>

#### *Proteína precursora de amiloide*

Se ha informado que este ratón padece un incremento en la susceptibilidad a isquemia cerebral focal, modificaciones en el comportamiento y gliosis; sin embargo, no se encontraron depósitos de material amiloide en el cerebro o vasos sanguíneos.<sup>40</sup> Se ha empleado como modelo para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.<sup>41</sup>

#### *CuZn-SOD (superóxido-dismutasa)*

Existe un ratón que sobreexpresa el gen humano que codifica para la superóxido-dismutasa, fue creado con el fin de entender la importancia de los radicales superóxido en la patogénesis de la isquemia cerebral. En este modelo no se hallaron diferencias en presión arterial. Se observó que las áreas de isquemia inducida experimentalmente a nivel cerebral fueron de menor diámetro en ratones transgénicos en relación con ratones no transgénicos, y la cantidad de agua en el edema fue significativamente menor.<sup>42</sup> Este modelo animal se ha usado en el estudio del vasoespasmo.<sup>43</sup>

#### *Proteína relacionada con la hormona paratiroidea*

A través del diseño de un ratón transgénico capaz de expresar tanto la proteína relacionada con la hormona paratiroidea y su receptor, se demostró que ésta posee la función de ser un vasodilatador. Estos animales murieron a los 9.5 días en su desarrollo embrionario y manifestaron anomalías cardíacas, aunado a disminución en la presión sanguínea.<sup>44</sup>

En el modelo transgénico para el receptor de la proteína se observó que los ratones se desarrollan de manera normal y no presentan alteraciones en ningún órgano, aunque se ha informado incremento en el peso del estómago, estas observaciones contrastan con

**Cuadro 1**

RESUMEN DE ALGUNOS ANIMALES TRANSGÉNICOS EMPLEADOS COMO MODELOS PARA EL ESTUDIO DEL ENDOTELIO  
 SUMMARY OF CERTAIN TRANSGENIC ANIMALS USED AS MODELS FOR  
 ENDOTHELIUM STUDIES

<i>Product of overexpression</i>	<i>Species</i>	<i>Description</i>	<i>Reference</i>
e-NOS	Mouse	Hypertensive, without alterations in rennin and catecholamine concentration.	31
Endothelin 1	Mouse	Interstitial fibrosis, cystitis, glomerulosclerosis, normal blood pressure.	32, 35
Renin- angiotensin System	Rat and mouse	Variable phenotypes depending on the transgene species (normotensive or hypertensive).	32, 36
IL-10	Mouse	Normal T and B lymphocyte development, reduction of antitumoral activity.	37
Apolipoprotein	Rabbits	Atherosclerosis development with supply of high cholesterol diets.	38
Erythropoietin	Mouse		39
Amyloid precursor protein	Mouse	Changes in behavior, cerebral ischemia susceptibility increase, amyloid deposits are not observed in brain and blood vessels.	40, 41
CuZn-SOD	Mouse	Reduction of cerebral ischemia zones experimentally induced.	42, 43
Protein related to parathyroid hormone and its receptor	Mouse	Embryo death, cardiac abnormalities, low blood pressure. For the receptor there are no alterations in normal development of mice.	44

E; the animals show hypertension accompanied by an increase in number and time of presentation of atherosclerotic lesions.<sup>50</sup>

In models where e-NOS is pharmacologically inhibited, it has been reported that there is no specific inhibitor for this enzyme.

### *Prostacyclin receptor*

Prostacyclin is an eicosanoid origin substance that works as a potent vasodilator, antithrombotic and anticoagulant. It has been observed that knockout mice produced for this chemical mediator are normal from the reproductive point of view and they are also normal in blood pressure; nevertheless, their susceptibility to thrombosis increases, and their response to pain and to inflammation are reduced. From this model it has been proposed that prostacyclin is an antithrombotic agent.<sup>51</sup>

### *Endothelins (ET) and endothelin receptors*

Endothelins are 21 amino acid peptides that are vasoconstrictors at endothelium level. Three isoforms have been described: ET1, ET2, ET3, that have been

las obtenidas del ratón transgénico para la proteína relacionada con la hormona paratiroidea, ya que en éste se presentan anormalidades en los huesos y en el corazón.

En el Cuadro 1 se presenta de manera resumida la información con respecto a los animales transgénicos empleados en el estudio del endotelio.

### ***Animales knockout para el estudio del endotelio***

#### *Óxido nítrico sintetasa endotelial (e-NOS)*

El óxido nítrico es considerado como regulador de la homeostasis vascular, es potente vasodilatador útil para regular la presión arterial, también inhibe la coagulación mediante la inhibición de la adhesión plaquetaria.<sup>45</sup>

El gen que codifica para la óxido nítrico sintetasa posee diversas isoformas i-NOS linfocitos y macrófagos, n-NOS (tejido nervioso) y e-NOS (endotelio).<sup>46</sup>

Con respecto a los modelos animales empleados en el estudio de óxido nítrico sintetasa y sus isoformas, el modelo ideal es el ratón modificado genéticamente (transgénicos y knockout). Aquí sólo se tratará la isoforma e-NOS, ya que se expresa en el endotelio

found in humans and other mammals. In humans the most common form is ET-1. For the study of these molecules there are knockout mice for their receptors that are called ETA, ETB, ETC; the most important ones in humans are ETA and ETB.<sup>52,53</sup>

It has been reported that mice knockout for endothelin 1 (ET-1) and their receptor die at the time of birth, since they have respiratory failure with morphological abnormalities in organs and tissues derived from the pharyngeal arch and they have high blood pressure.<sup>54</sup> In another experimental model the expression of the receptor for endothelin 1 has not been achieved, only in cardiomyocytes; these animals are viable and show normal growth up to adult age. The heart of these animals, examined by echocardiography, do not show anatomical or contraction abnormalities.<sup>53</sup>

### *Receptor of endothelin B*

Vascular endothelium only expresses the type of receptors for endothelin B. Phenotypically, this knockout mouse is characterized by a collar of white spots on the neck, together with megacolon. Studies in this model have permitted the establishment that at 14 weeks of age the homozygous mouse has high systolic blood pressure in relation with the wild type.<sup>55-57</sup>

When treating the knockout mice group with a low salt diet, during two weeks high blood pressure was reduced as compared with the other knockout group that received a conventional diet not low in salt.<sup>55-57</sup>

### *Endothelin A*

This knockout mouse is characterized by craniofacial and cardiac morphogenesis defects. Alterations are observed in hyoid bones, abnormalities in jaw bone joints, reduction of the zygomatic arch, presence of osseous formations that extend ventrocaudally from the jaw, favoring a laminar structure that fuses with the endochondral bone near the anterior basisphenoid bone. This osseous fusion results in the obliteration of respiratory airways that contributes to a mechanical asphyxiation. There are abnormalities in the osseous structures that form the oral cavity, and thus they cannot breath through there. There are defects on the septa of the heart and in artery formation. The alterations resemble the cardio-facial-velum syndrome in humans, that are characterized by defects in cardiovascular tract and craniofacial deformities.<sup>58-59</sup>

### *Vimentin*

It has been observed that homozygous animals that lack vimentin reproduce without any anomalies, even

vascular y tiene relevancia en la regulación del tono vascular y perfusión de los tejidos.<sup>47</sup>

A partir de 1995 se han producido animales knockout para esta enzima. Éstos se desarrollaron para dilucidar la función de la e-NOS en la hipertensión. Los ratones presentan hipertensión, por ello se propone que el óxido nítrico derivado regula la presión sanguínea.<sup>48</sup> El fenotipo de hipertensión se confirmó un año después por Shesely *et al.*,<sup>49</sup> en estos ratones también se refiere baja de peso y trastornos en la marcha cuando llegan a 14 semanas. En estudios posteriores se han observado otras características, como modificaciones en el comportamiento, anomalías cardíacas en las válvulas, resistencia a la insulina. Se ha observado que la mayoría de estos animales knockout mueren después del nacimiento, a causa de alteraciones cardíacas que no permiten su sobrevivencia y presentan alta sensibilidad a la acción contráctil inducida por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.<sup>47</sup>

A partir de estos estudios se ha propuesto que el e-NOS se encuentra implicado no únicamente en la regulación de la presión arterial, sino también en la homeostasis de lípidos, glucosa y angiogénesis.<sup>50</sup>

Hasta el momento se ha logrado obtener ratones doble knockout, tanto para la e-NOS como para la apolipoproteína E; los animales presentan hipertensión acompañada de aumento en número y en tiempo de aparición de lesiones propias de arteriosclerosis.<sup>50</sup>

En modelos en los que de manera farmacológica se inhibe la e-NOS, se ha referido que no existe inhibidor específico para tal enzima.

### *Receptor de prostaciclina*

La prostaciclina es una sustancia de origen eicosanoide, funciona como potente vasodilatador, antitrombótico y anticoagulante. Se ha observado que los ratones knockout producidos para el receptor de este mediador químico son normales desde un enfoque reproductivo y también son normotensos; sin embargo, su susceptibilidad a la trombosis se incrementa; asimismo, su respuesta al dolor y a la inflamación están disminuidos. A partir de este modelo se ha propuesto que la prostaciclina es un agente antitrombótico.<sup>51</sup>

### *Endotelinas (ET) y receptores de endotelinas*

Las endotelinas son péptidos de 21 aminoácidos con funcionalidad de vasoconstrictores a nivel del endotelio, se han descrito tres isoformas ET1, ET2, ET3, que se han encontrado en el humano y otros mamíferos. En el humano, la forma más común es ET-1, para el estudio de estas moléculas existen ratones



though by diverse methodologies it was confirmed that vimentin was not expressed. Nevertheless, it has been reported that this mouse has an arterial vasodilatation induced by blood flow, accompanied by an alteration in the balance of endothelin 1 and nitric oxide;T in a study where alteration was induced by ligation of the carotid artery, it was observed that in mice that lack vimentin the artery increases its lumen diameter and wall mass, when compared to mice with the gene present and functional.<sup>60</sup>

### *Angiotensinogen*

Knockout mice for this protein have been obtained. Depending on the genetic bases, the mutation directed to this gene may cause a lethal phenotype, even though the cause has yet to be cleared up. Experiments have been performed that consist of crosses between knockout mice with transgenic mice that overexpress angiotensinogen of rat, or of human origin and with this the offspring do not die.<sup>32</sup>

### *Rennin*

Knockout for Ren-2 gene mice are healthy, do not show alterations in blood pressure and only an increase in rennin is observed as well as decrease in plasma concentration of pro-rennin. Experimental evidence put together from models knockout for rennin genes (Ren 1 and 2) suggests there is a redundant function for both genes and the functional absence of one of the genes may be compensated in a large amount by the other.<sup>32</sup>

### *Receptor of angiotensin*

Mice have been produced knockout for receptor AT1, that has two isoforms: AT1A and AT1B, present in mice and rat; nevertheless, it has been learned that in the models knockout the most important isoform is AT1A, since these animals develop hypotension and renal abnormalities.<sup>32</sup>

### *Interleukin 10 (IL-10)*

Interleukin 10 is an anti-inflammatory cytokine, and knockout mice have been obtained for it. It is known that in these animals, after the administration of lipopolysaccharides, the expression of i-NOS is increased. It has been reported that in them lipopolysaccharides produce hypotension, and leukocyte and endothelium interaction increase.

On the other hand, relaxation response to acetylcholine is similar to mice not genetically altered that possess IL-10.<sup>61</sup> A knockout IL-10 mouse has

knockout para sus receptores que se designan ETA, ETB, ETC; los más importantes en humanos son el ETA y el ETB.<sup>52,53</sup>

Se ha informado que los ratones knockout de endotelina 1 (ET-1) y su receptor mueren al momento del nacimiento, pues presentan falla respiratoria con anomalías morfológicas en los órganos y tejidos derivados del arco faríngeo, además presentan elevada presión sanguínea.<sup>54</sup> En otro modelo de experimentación no se ha logrado la expresión del receptor para endotelina 1, únicamente en los cardiocitos; estos animales son viables y presentan crecimiento normal hasta la edad adulta. Asimismo, el corazón de estos animales, examinados mediante ecocardiografía, no presenta anomalías anatómicas ni en su contracción.<sup>53</sup>

### *Receptor de endotelina B*

El endotelio vascular sólo expresa el tipo de receptores para endotelina B. Fenotípicamente, este ratón knockout se caracteriza porque presenta un collarín de manchas blancas en el cuello, acompañado de megacolon. Los estudios en este modelo han permitido establecer que a las 14 semanas de edad, el ratón homocigoto presenta presión sanguínea sistólica elevada en relación con el tipo silvestre.<sup>55-57</sup>

Al tratar un grupo de ratones knockout con dieta baja en sal, durante dos semanas, la presión sanguínea elevada disminuyó al compararse con otro grupo de knockout a los que se les administró dieta convencional no baja en sales.<sup>55-57</sup>

### *Endotelina A*

Este ratón knockout se caracteriza por presentar defectos en la morfogénesis craneofacial y cardiaca. Se le observan alteraciones en los huesos hioides, anomalías en la articulación del hueso de la mandíbula, decremento en el arco zigomático, presencia de formaciones óseas que se extienden ventrocaudalmente a partir de la mandíbula, propiciando una estructura en forma de lámina que se fusiona con el hueso endocondrial cercano a la región anterior del hueso basisfenoides. Esta fusión ósea resulta en una obliteración de las vías respiratorias aéreas, ello contribuye a asfixia mecánica. También se presentan anomalías en las estructuras óseas que conforman la cavidad oral, que le impide respirar por ella. En el corazón se observa defecto en los septos y en la formación de arterias. Sus alteraciones semejan el síndrome cardiovlofacial en humanos, que se caracteriza por defectos en el tracto cardiovascular y deformidades craneofaciales.<sup>58-59</sup>

been reported that has a greater susceptibility to the development of atherosclerotic lesions, when compared to the transgenic mouse, when fed an atherosclerosis inducing diet.<sup>61</sup>

### *Intercellular adhesion molecule (ICAM-1)*

This adhesion molecule is expressed in leukocytes, monocytes and endothelium, epithelium and hepatic cells.<sup>62</sup> Knockout mice that lack ICAM-1, have alterations in their immunological system as well as inflammatory processes, reduction of neutrophil migration in chemically induced peritonitis, resistance to septic shock and reduction in contact hypersensitivity. Another characteristic is the development of spontaneous obesity.<sup>63</sup> Also, renal acute ischemia has been reported in this animal.<sup>62</sup>

### *p Selectin*

Alteration of leukocyte physiology has been reported in this model, as well as increase in circulating neutrophils and modification in adhesion and diapedesis of leukocytes mainly in mesenteric vessels; also a delay in neutrophil recruitment in peritoneal cavity has been observed under experimentally induced inflammation conditions.<sup>64-66</sup>

### *GMPc (cGKI) dependent cycline*

Within the biological processes of tissue perfusion and cardiovascular homeostasis, that involve muscles, kinase cGKI protein has a relaxing effect, therefore the phenotype of this mouse is characterized by the loss of nitric oxide and GMPc relaxation and this causes alterations at cardiac and intestinal levels. Nevertheless, this mouse retains the muscular relaxation response induced by AMPc.<sup>67</sup> It has been reported that this mouse has erectile dysfunction and reduction of fertility.<sup>68</sup>

### *Receptor of bradykinin B2*

Kinins are important cardiovascular homeostasis regulators, as well as of inflammation and illness of the individual. Bradykinin specifically induces vasodilatation and diuresis. Mice that do not possess the receptor for this molecule have an increase in blood pressure and are susceptible of developing hypertension when subjected to salt rich diets.<sup>69</sup> Nevertheless, in other studies where knockout for this receptor were obtained, alterations in blood pressure or cardiovascular system were not found. Several explanations in relation with the genetic bases have been proposed, even though genetic expression

### *Vimentina*

En los animales homocigotos carentes de vimentina, se observa que se reproducen sin ningún tipo de anomalía, a pesar de que por diversas metodologías se confirmó la no expresión de vimentina. Sin embargo, se ha referido que este ratón presenta vasodilatación arterial inducida por el flujo sanguíneo, acompañado de alteración en el balance de endotelina 1 y óxido nítrico; asimismo, en un estudio en el que se indujo alteración mediante la ligadura de la arteria carótida, se observó que en ratones carentes de vimentina la arteria incrementa el diámetro de su lumen y la masa de su pared, con respecto a ratones en los que el gen está presente y es funcional.<sup>60</sup>

### *Angiotensinógeno*

Se han obtenido ratones knockout para esta proteína. Dependiendo del trasfondo genético, la mutación dirigida de este gen puede provocar un fenotipo letal, aunque la causa no ha sido aún esclarecida, se han efectuado experimentos que consisten en cruzar ratones knockout con ratones transgénicos que sobreexpresan el angiotensinógeno de la rata, o el angiotensinógeno de origen humano o de ratón, con lo que las crías de estos animales no mueren.<sup>32</sup>

### *Renina*

Los ratones knockout del gen Ren-2 son saludables, no presentan alteraciones en la presión sanguínea, y sólo se observa incremento en renina y decremento en las concentraciones plasmáticas de pro-renina. La evidencia experimental conjuntada a partir de modelos knockout de los genes de la renina (Ren 1 y 2) sugiere una función redundante para ambos genes, y que la ausencia funcional de alguno de los dos genes puede ser compensada en gran parte por el otro.<sup>32</sup>

### *Receptor de angiotensina*

Se han producido ratones knockout para el receptor AT1, que posee dos isoformas: AT1A y AT1B, presentes en el ratón y en la rata; sin embargo, se ha aprendido que en los modelos knockout la isoforma más importante es la AT1-A, pues estos animales desarrollan hipotensión y anormalidades renales.<sup>32</sup>

### *Interleucina 10 (IL-10)*

La interleucina 10 es una citocina antiinflamatoria, de ella se han obtenido ratones knockout. Se sabe que en estos animales, tras ser sometidos a la administración de lipopolisacáridos, la expresión de i

differences have been identified in the knockout animals when compared with the wild type that use microarrays.<sup>70</sup>

### *Receptor of prostaglandin EP2*

Prostaglandins possess diverse biologic effects, within these is prostaglandin PGE<sub>2</sub> that has effects on blood pressure homeostasis. Mice without the receptor for EP<sub>2</sub> (prostaglandins) are infertile, have systolic blood pressure alterations when compared to the wild type, increase of blood pressure when subjected to high salt diets; therefore, it has been suggested that this receptor is important in two biological aspects: homeostasis of blood pressure and *in vivo* ovocyte fertilización.<sup>71</sup>

### *Elastin*

Elastin is an extra-cellular matrix protein that constitutes approximately 50% of the aorta. It has been characterized in the supra-avalvular aortic stenosis ailment. A knockout animal for this important protein was obtained, where an increase in the concentric elastin layers that surround the aorta were observed. Similar changes were reported in pulmonary artery, these were accompanied by an increase in smooth muscle and the changes are apparent from the time of birth.<sup>72</sup>

### *Estrogen receptor*

Even though there are already murine models that do not express the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of the estrogen receptor, the cardiac phenotype of the knockout for (*erko*) isoform has been characterized. It presents low levels of nitric oxide in the cardiovascular system, delay in cardiac depolarization and it retains the protection capacity against vascular lesions that estrogens produce.<sup>73</sup>

### *Apolipoprotein E (apoE)*

There are knockout animals for apoE, that have five more times cholesterol in plasma when compared to non-altered mice. These animals develop cholesterol deposits in proximal aortas at three months of age. Lesions progress and by eight months severe occlusion of coronary arteries occur. A mouse knockout to this protein together with the LDL receptor, subjected to certain dietary conditions is capable of developing atherosclerosis.<sup>74</sup>

In Table 2 there is a summary of the animal knockout models that are available up until now.

NOS se incrementa; asimismo, se refiere que en ellos los lipopolisacáridos producen hipotensión y aumento en la interacción entre leucocitos y endotelio.

Por otra parte, la relajación en respuesta a acetilcolina es similar a los ratones no manipulados genéticamente que poseen IL-10.<sup>61</sup> Se ha documentado que el ratón knockout IL-10 posee mayor susceptibilidad para desarrollar lesiones propias de arteriosclerosis, en comparación con el ratón transgénico, cuando se le alimenta con dieta que induce aterosclerosis.<sup>61</sup>

### *Molécula de adhesión intercelular (ICAM-1)*

Esta molécula de adhesión se expresa en leucocitos, células endoteliales, epiteliales, hepatocitos y monocitos.<sup>62</sup> Los ratones knockout que carecen de ICAM-1, poseen alteraciones tanto del sistema inmunológico como del proceso inflamatorio, disminución en la migración de neutrófilos en peritonitis inducida químicamente, resistencia a choque séptico y disminución en la hipersensibilidad por contacto. Otra característica que presenta es el desarrollo de obesidad de manera espontánea.<sup>63</sup> Asimismo, se ha referido que este animal presenta protección a isquemia renal aguda.<sup>62</sup>

### *p Selectina*

En este modelo se ha informado que existen alteraciones en la fisiología de los leucocitos, aumento en el número de neutrófilos circulantes y modificaciones en la adhesión y diapedesis de leucocitos, principalmente en vasos mesentéricos; también se ha observado retraso en el reclutamiento de neutrófilos en cavidad peritoneal bajo condiciones de inflamación inducidas experimentalmente.<sup>64-66</sup>

### *Ciclina dependiente de GMPc (cGKI)*

Dentro de los procesos biológicos de perfusión tisular y homeostasis cardiovascular, que involucra la contracción del músculo, la proteína cinasa cGKI posee acción relajadora, por lo que el fenotipo de este ratón se caracteriza por pérdida de la relajación dependiente de óxido nítrico y GMPc, ello provoca alteraciones en los niveles cardiaco e intestinal. Sin embargo, este ratón conserva la respuesta de relajación muscular inducida por AMPc.<sup>67</sup> Asimismo, se ha informado que este ratón presenta disfunción eréctil y disminución en la fecundidad.<sup>68</sup>

### *Receptor de bradikinina B2*

Las kininas son importantes mediadores en la

### *Recommendations for the proper use of genetically altered animals.*

To obtain genetically altered mice, reference has been made to the most common technique that uses strain 129 embryostem cells that when genetically altered they are introduced into blastocytes of the strain c57BL/6. To eliminate genetic heterogeneity a retrocross program is performed so that after seven generations it causes a > 99% uniform genetic background.<sup>75</sup>

Control of the genetic background is essential in these genetically altered models; it is known that genetic mutations may correspond to different phenotypes in different genetic backgrounds.<sup>26,75</sup>

There are limitations to the use of genetically altered animals. One limiting aspect consists of the fact that a knockout animal may have the function of this gene compensated by other genes, or an eliminated gene may have redundant genes from the functional point of view that may substitute the function. Whichever one of these conditions occurs it would be the cause for not being able to detect any changes in the genetically altered animal's phenotype, it is recommended that pharmacological inhibitors be administered in the genetically altered animal that may permit the attainment of experimental evidence of the non-participation of compensation mechanisms.

Another aspect is cost, since these animals generate heavy economic investments for their creation, maintenance and reproduction; their use should be ethical, taking into consideration the substitution of animal models for others and the reduction of their use in experimentation. After taking these things into consideration, the animals used as experimental models shall receive treatments in compliance with current legislations of each country.<sup>2</sup>

### *Advantages in the use of genetically altered animal models*

Study of endothelium physiology in health and disease is one of the most relevant topics within biomedicine today. This is the way the function of a protein molecule that comes from a gene is known and the expression of it may be impeded or overexpression induced.<sup>26,29</sup> Undoubtedly, the most studied mammal by these methods has been the mouse, since it has technical facilities in relation to embryo manipulation that does not occur in other species, especially in reference to the study of endothelial physiology. It is said that the most studied model is the genetically altered mouse and there are large efforts being

homeostasis cardiovascular, así como en la inflamación y padecimiento del individuo. Específicamente, la bradikina induce vasodilatación y diuresis. Los ratones que no poseen el receptor a esta molécula presentan incremento en la presión sanguínea y son susceptibles a desarrollar hipertensión cuando se someten a dietas ricas en sal.<sup>69</sup> Sin embargo, en otros trabajos en los que se elaboraron ratones knockout para este receptor no se encontraron alteraciones en presión sanguínea ni en el sistema cardiovascular. Se han propuesto diversas explicaciones atribuibles al fondo genético, a pesar de que se han identificado diferencias en la expresión génica de los knockout en relación con los de tipo silvestre que utilizan microarreglos.<sup>70</sup>

### *Receptor de prostaglandina EP2*

Las prostaglandinas poseen diversos efectos biológicos, dentro de los cuales la prostaglandina PGE2 posee efectos en la homeostasis de la presión sanguínea. Los ratones sin el receptor de (prostaglandinas) EP2 son infértiles, presentan alteraciones en la presión sistólica en comparación con el tipo silvestre, aumento en la presión sanguínea cuando son sometidos a dietas altas en sal, por lo que se ha propuesto la importancia de este receptor en dos aspectos biológicos que son: homeostasis de la presión sanguínea y fertilización *in vivo* del ovocito.<sup>71</sup>

### *Elastina*

La elastina es una proteína de la matriz extracelular que constituye alrededor de 50% de la aorta. También se han caracterizado en el padecimiento de estenosis aórtica supra valvular. Se obtuvo un animal knockout a esta importante proteína, en el que se observó incremento en el número de capas concéntricas de elastina que rodean a la aorta. Se informaron cambios similares en la arteria pulmonar, éstos se acompañan de aumento en el músculo liso y son aparentes desde el momento del nacimiento.<sup>72</sup>

### *Receptor de estrógenos*

Aunque ya existen modelos murinos que no expresan las isoformas y del receptor a estrógenos, se ha caracterizado el fenotipo cardiaco del knockout de la isoforma (erko), que presenta niveles bajos de óxido nítrico en el sistema cardiovascular, retraso en la despolarización cardiaca y conserva la capacidad de proteger contra lesiones vasculares que tienen los estrógenos.<sup>73</sup>

Cuadro 2

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS ANIMALES *KNOCKOUT* ÚTILES EN EL ESTUDIO DEL ENDOTELIO  
SUMMARY OF THE DESCRIPTION OF CERTAIN *KNOCKOUT* ANIMALS USEFUL FOR ENDOTHELIUM STUDY

<i>Genic product that is not expressed</i>	<i>Species</i>	<i>Description</i>	<i>Reference</i>
e-NOS	Mouse	Hypertension, weight loss, locomotion alterations, abnormalities in cardiac valves, resistance to insulin, neonatal death.	48, 49
e-NOS / apolipoprotein E	Mouse	Increment of contractile function due to hypertension accompanied by increase of number of arteriosclerosis lesions.	50
	Mouse	Normotensive, without reproductive alterations increase in susceptibility to thrombosis, reduced response to pain and inflammation.	51
Prostacyclin receptor	Mouse	Neonatal death, morphological alterations of organs and tissues derived from the pharyngeal arch, that causes respiratory failure and increase in blood pressure, this last is observed in the homozygote ET-1 <i>-/-</i> . Alterations are not observed in the heterozygote (ET-1 <i>+/-</i> ) it is fertile but has an increase in blood pressure.	52, 53, 54
Endothelin-1	Mouse	Recessive phenotype of mice that has a type of collar of white spots on the region of the neck and megacolon that causes early death.	55, 56, 57
Endothelin-B receptor	Mouse	Craneofacial and cardiovascular defects, they are born live and then die, similar in phenotype to endothelin-1 <i>knockout</i> .	58, 59
Endothelin-A receptor	Mouse	Without reproductive alterations, acute arterial vasodilatation, alterations in endothelin-1 and nitric oxide balance.	60
Vimentin	Mouse	Lethal	32
Angiotensinogen	Mouse	Without blood pressure alterations.	32
Rennin	Mouse	Hypotension and renal alterations.	32
Angiotensin receptor	Mouse	Increment in atherosclerosis development susceptibility, similar vascular response as genetically non-altered mice for acetylcholine, lipopolysaccharides cause in them hypotension and increase in e-NOS concentration .	61
IL-10	Mouse	Alterations to the immune system and inflammatory process, reduction in neutrophil migration, resistance to septic shock, reduction of contact allergy, obesity.	62,63
ICAM-1	Mouse	Defects in leukocyte function, increase in circulating neutrophils, lack of interaction between leukocytes and endothelium in small mesenteric veins, delay in neutrophil recruitment in peritoneal cavity under experimental inflammation conditions.	64, 65, 66
p-Selectin	Mouse	Absence of smooth muscle nitric oxide-elicited and cGMP relaxation, that causes severe cardiac and intestinal dysfunction. These animals have low fertility due to erectile dysfunction.	67, 68
CGKI	Mouse	Increase in blood pressure, vasoactive agents' end of action, increase in heart weight.	69, 70
Bradykinin B2 receptor	Mouse	Infertility, systolic pressure alterations.	71
Prostaglandin receptor	Mouse	Increase in number of concentric layers that surround the aorta and smooth muscle in approximately 25%, without alterations in behavior or macroscopic aspect during life span. This is observed in the homozygous mouse ( <i>+/-</i> ) .	72
Elastin	Mouse	Reduction of nitric oxide, preservation of protector capacity of estrogens in vascular lesions, increase in calcium channels, delayed cardiac depolarization, non-functional spermatozoids, lack of female receptivity to males and infertility.	73
Estrogen receptor ( $\alpha$ ERKO)	Mouse	Increase of plasma concentrations of cholesterol, deposit of cholesterol in proximal aorta (three months of age) occlusion of coronary arteries by cholesterol (eight months of age).	74
ApoE	Mouse		



made to create knockout animals.<sup>29</sup> In general, these genetically altered animals have several uses, where the production of proteins of interest is highlighted, as well as the creation of animal models useful in the study of human diseases.<sup>74</sup>

From observations of these animal phenotypes it has been said that results have been predictable and up to veritably surprising, due to the fact that the animal model does not show alterations when the expression of a gene is suspended, since compensatory mechanisms can reestablish gene functionality with other genes that were not altered.

It must also be mentioned that these models have advantages over the ones that already exist, in which pharmacological inhibitors are used, since in these an important factor may be the limited specificity of the pharmacological agents that function as enzymatic inhibitors or receptor antagonists.

In animal models that overexpress some genic product, the individual effect may be assessed and this may contribute to the development of a pathology or preserve endothelium regulation.

In order to reduce the improper use of experimental animals, it has been proposed the development of substitutive models under research such as: computer simulations and *in vitro* experimentation; both strategies are oriented to the reduction of at least the number of animals used in biomedical experimentation.<sup>2</sup> Nevertheless, if animal models are used rationally and ethically, these shall continue to be in many cases irreplaceable in the advance of contemporary medicine.

In conclusion, the advances in experimental methodology in molecular biology, that tend to achieve a more specific expression of transgenes and knockout genes, shall contribute to clear up relevant biological mechanisms in endothelium physiopathology, until knowledge advances shall be such that in the near future successful treatments may be designed for diseases of public health importance, such as atherosclerosis.<sup>5</sup>

## Acknowledgments

This study is part of the PAPIIT, DGAPA-UNAM (IN212101) project and the PROMEP (103.5/04/28625) project, we thank the support granted by both Mexican Institutions.

## Referencias

1. Aluja A. Animales de laboratorio y la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Méd Méx* 2002;138:295-298.
2. Aluja A. La ética en la investigación científica y en la enseñanza con animales vertebrados. En: Aluja M,

## Apolipoproteína E (apoE)

Existen animales knockout para apoE, que presentan cinco veces más de colesterol en plasma, en comparación con ratones no manipulados. Dichos animales desarrollan depósitos de colesterol en las aortas proximales a los tres meses, estas lesiones progresan y a los ocho meses se observa severa oclusión de las arterias coronarias. Se ha referido un ratón knockout de esta proteína junto con el receptor de LDL, que sometido bajo ciertas condiciones dietarias es capaz de desarrollar aterosclerosis.<sup>74</sup>

En el Cuadro 2 se presenta un resumen de los modelos animales knockout disponibles hasta el momento.

## Recomendaciones para el uso adecuado de animales genéticamente manipulados

Se ha referido que en la obtención de ratones manipulados genéticamente, la técnica más común contempla utilizar células troncoembrionarias de la cepa 129, las cuales, tras ser manipuladas genéticamente, se introducen en blastocistos de la cepa c57BL/6; para eliminar la heterogeneidad genética se realiza un programa de retrocruzas, ello provoca que después de siete generaciones, el trasfondo genético sea > 99% uniforme.<sup>75</sup>

La importancia de controlar el fondo genético es esencial en este tipo de modelos genéticamente manipulados; se sabe que las mutaciones genéticas pueden corresponder a distintos fenotipos en distintos trasfondos genéticos.<sup>26,75</sup>

Existen también limitaciones en el uso de los animales manipulados genéticamente. Un aspecto limitante consiste en la posibilidad de que en un animal knockout exista una compensación de la función de este gen por otros, o que algún gen eliminado tenga genes redundantes desde un enfoque funcional, que sustituyan su función. Cualquiera de estas dos condiciones originará que no haya cambios detectables en el fenotipo del animal manipulado, por lo que se recomienda administrar inhibidores farmacológicos en el animal manipulado genéticamente, que permitan obtener evidencias experimentales de la no participación de mecanismos compensatorios.

Otro aspecto es el costo, pues estos animales generan cuantiosas inversiones económicas para su creación, mantenimiento y reproducción; también se recomienda su utilización ética, en la que se considerará la sustitución de modelos animales por otros y su disminución en la experimentación. Después de estas reflexiones, los animales utilizados como

- Birke A, editores. El papel de la ética en la investigación científica y la educación superior. México DF: Academia Mexicana de Ciencias, 2003: 175-193.
3. Alexander WR, Dzau VJ. Vascular Biology. The past 50 years. *Circulation* 2000;102:112-116.
  4. Krinke GJ. The laboratory rat. Slovenia: Academic press, 2000.
  5. Triggle C, Hollenberg M, Anderson T, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, *et al.* The endothelium in health and disease -A target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res* 2003 ; 39: 249-267.
  6. Cajero-Juarez M, Avila B, Ochoa A, Garrido-Guerrero E, Varela-Echavarría A, Martínez de la Escalera G, *et al.* Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 2002;81:1-8.
  7. Rush WE, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: 1378-1387.
  8. Dixon JL, Stoops JD, Parker JL, Laughlin MH, Weisman GA, Sturek M. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2981-2992.
  9. Mehta D, Angelini GD, Bryan AJ. Experimental models of accelerated atherosclerosis syndromes. *Int J Cardiol* 1996;56:235-257.
  10. Badimón L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55: 17-26.
  11. Fuster V, Ip JH, Baldimon JJ, Stein B, Chesbro JH. Importance of experimental models for the development of clinical trials on thromboatherosclerosis. *Circulation* 1991;83:15-25
  12. Alegría E, Rodríguez JA, Grau A, Belzunce M, Martínez Caro D. Modelo porcino de disfunción endotelial inducida por hipercolesterolemia. Efecto de las vitaminas C y E. *ANALES Sis San Navarra* 1999; 22 Suppl 3:113-21.
  13. Logan SJ, Sharma A. Potential use of genetically modified pigs as original donors for transplantation into humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:1020-1025.
  14. Lafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Lubahn DB, *et al.* Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha deficient mice. *Nat Med* 1997;5:545-548.
  15. Xiang D, Miller A, Nova KL, Rocha R, Chen YF, Oparil S. Estradiol and progestins differentially modulate leukocyte infiltration after vascular injury. *Circulation* 2004;109:234-241.
  16. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002; 23:665-686.
  17. Bravo G, Larios F, Rojas-Martínez R, Hong E, Salazar LA, Guisár-Sahagún G. Early changes in nitric oxide synthase activity in atrial intramural arteries following experimental spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 1999;271:37-40.
  18. García T. Fundamentos de inmunobiología. México

modelos de experimentación recibirán un trato conforme a las legislaciones vigentes de cada país.<sup>2</sup>

### ***Ventajas en el uso de modelos animales manipulados genéticamente***

El estudio de la fisiología de los endotelios en salud y enfermedad es de los temas más relevantes dentro de la biomedicina actual. Así se sabrá la función de una molécula proteínica proveniente de un gen y se podrá impedir la expresión de éste o inducir su sobreexpresión.<sup>26,29</sup> Es indudable el hecho de que el mamífero más estudiado hasta el momento mediante el uso de estas metodologías es el ratón, ya que presenta facilidades técnicas respecto de la manipulación de los embriones, lo que no se presenta en otras especies y especialmente en lo referente al estudio de la fisiología endotelial. Se afirma que el modelo más estudiado es el ratón manipulado genéticamente y que existen mayores esfuerzos en el sentido de crear animales knockout.<sup>29</sup> En general, estos animales manipulados genéticamente poseen diversos usos, entre ellos destacan la producción de proteínas de interés y la creación de modelos animales útiles para el estudio de enfermedades que aquejan al humano.<sup>74</sup>

De las observaciones desprendidas de los fenotipos en estos animales se ha expresado que éstas van desde las predecibles hasta fenotipos verdaderamente sorprendentes, debido a que en casos en los que la expresión de un gen es suspendida, el modelo animal no presenta alteraciones, ya que los mecanismos compensatorios logran restablecer la funcionalidad del gen con otros genes que no han sido afectados.

También es necesario mencionar que estos modelos presentan ventajas sobre los ya existentes, en los que se emplea el uso de inhibidores farmacológicos, ya que en éstos un factor importante es la limitada especificidad de los agentes farmacológicos que funcionan como inhibidores enzimáticos o antagonistas de receptores.

En los modelos animales que sobreexpresan algún producto génico se pueden valorar sus efectos en los individuos, lo que puede contribuir al desarrollo de una patología o a conservar la regulación de los endotelios.

Con el fin de disminuir el mal uso de los modelos animales de experimentación, se propone el desarrollo de modelos sustitutivos que se encuentran en investigación, como los simuladores computacionales y experimentos realizados *in vitro*; ambas estrategias están orientadas a reducir cuando menos el número de animales que se utiliza en la experimentación biomédica;<sup>2</sup> sin embargo, si se da un aprovechamiento racional y ético a los modelos animales, éstos seguirán siendo, en muchos casos, insustituibles para el avance de la medicina contemporánea.

- (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.
19. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* 2001;173:35-43.
  20. Zhou X, Stremmes S, Hasson GK. Evidence for local immune response in atherosclerosis CD 4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 1996;149:359-366.
  21. Zhou X, Nicolletti A, Elihage R, Hasson GK. Transfer of CD+ T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000;102:2919-2922.
  22. Reardon CA, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J, *et al.* Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1011-1016.
  23. Wang Cj, Wang FS, Yang KD, Weng L, Hsu C, Huang C, *et al.* Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction a study in rabbits. *J Orthop Res* 2003; 21:984-989.
  24. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim* 2004;28:246-256.
  25. Zubkov AY, Tibbs RE, Clower B, Ogihara K, Aoki K, Zhang JH. Morphological changes of cerebral arteries in a canine double hemorrhage model. *Neurosci Lett* 2002; 326:137-141.
  26. Bockamp E, Meringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, *et al.* Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genom* 2002;11:115-132.
  27. Dalloz F, Osinska H, Robbins J. Modelos animales genéticamente modificados. *Rev Esp Cardiol* 2001;54: 764-789.
  28. James FJ, Hewett TE, Robbins J. Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res* 1998;82:407-415.
  29. Farci FM, Sigmund CD, Vascular biology in genetically altered mice. *Circ Res* 1999;85:1214-1225.
  30. Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Hemost* 2001;149:351-357.
  31. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, *et al.* Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 102:2061-1071.
  32. Bader M. Transgenic animal models for the functional analysis of vasoactive peptides. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 1171-1183.
  33. Haperen RV, Cheng C, Mess BM, Van deel E, Waard M, Van Damme LCA, *et al.* Functional expression of endothelial nitric oxide synthase fused to green fluorescent protein in transgenic mice. *Am J Pathol* 2003;163:1677-1686.
  34. Hocher B, Liefeldt L, Thone-Reineke T, Orzechowski H, Distler A, Bauer C, *et al.* Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *Hypertension* 1996; 28: 196-201.
  35. Quaschnig T, Koçak S, Bauer C, Neumayer HH, Galle J, Hocher B. Increase in nitric oxide bioavailability

En conclusión, los avances en las metodologías experimentales de la biología molecular, tendientes a lograr una expresión más específica de los transgenes y genes knockout, contribuirán a esclarecer los mecanismos biológicos relevantes en la fisiopatología endotelial, hasta llegar a un nivel de avance del conocimiento que dentro del contexto de la biología vascular en un futuro no muy lejano contribuirá a diseñar tratamientos exitosos para enfermedades de importancia en salud pública, como la aterosclerosis.<sup>5</sup>

## Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto PAPIIT (IN212101), se agradece el apoyo otorgado por la DGAPA-UNAM.

- 
- improves endothelial function in endothelin-1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:479-483.
36. Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human rennin and human angiotensinogen. *Stroke* 2000;31:760-765.
  37. Hagenbaugh A, Sharma S, Dubbinet SM, Wei SHY, Aranda R, Cheroutre H, *et al.* Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. *Exp Cell Res* 1997; 185:2101-2110.
  38. Brosseau ME, Hoeg JM. Transgenic rabbits as models for atherosclerosis research. *J Lipid Res* 1999;40:365-375.
  39. Ruchizka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, Wit Cwagner K, Labuger Kelm M, *et al.* Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11609-11613.
  40. Zhang F, Eckman C, Younkin S, Hsia KK, Ladecola C. Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein. *J Neuro Sci* 1991; 17: 7655-7661.
  41. Chapman PF, White GL, Jhones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, *et al.* Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 1999; 2:271-276.
  42. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Cahan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing Cu Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88: 11158-11162.
  43. Kammi H, Kato I, Kinouchi H, Chan PH, Epstein CJ, Akabane A, *et al.* Amelioration of vasospasm after subarachnoid hemorrhage in transgenic mice overexpressing Cu Zn -superoxide dismutase. *Stroke* 1999;30: 867-872.
  44. Quian J, Lorenz JN, Maeda S, Sutliff RL, Weber C, Nakayama T, *et al.* Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice

- overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology* 1999; 140: 1826-1833.
45. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grishman MB, Cockrell AS, *et al.* Leucocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 1999;276:1943-1950.
  46. Lorens S, Nava E. Endotelio, hipertensión arterial y aterosclerosis. *Miocardio* 2003;5:161-166.
  47. Mungre N, Brendt DS, Stewart DJ, Husain M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol Scand* 2003;179:123-135.
  48. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, *et al.* Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-242.
  49. Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, *et al.* Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13176-13181.
  50. Albrecht E, Stegeman CA, Herringa P, Henning RH, Van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
  51. Murata T, Ushikubi F, Marsuoka, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, *et al.* Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997;388:678-682.
  52. Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani M, Yacoub MH. Endothelins and the lung. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:41-62.
  53. Kedzierski RM, Grayburn PA, Kisanuki YY, Williams CS, Hammer RE, Richardson JA, *et al.* Cardiomyocyte-specific endothelin A receptor knockout mice have normal cardiac function and an unaltered hypertrophic response to angiotensin II and Isoproterenol. *Mol Cell Biol* 2003;23:8226-8232.
  54. Kutihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, *et al.* Elevated blood pressure and skull abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994;368:703-710.
  55. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, *et al.* Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin- $\beta$  receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79:1267-1276.
  56. Ohuchi T, Kuwaki T, Ling G, Dewith D, Ju K, Onodera M, *et al.* Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am J Physiol* 1999;276:R1071-1077.
  57. Murakoshi N, Miyauchi T, Kakinuma Y, Ohuchi T, Goto K, Yanagisawa M, *et al.* Vascular endothelin-B receptor system *in vivo* plays a favorable inhibitory role in vascular remodeling after injury revealed by endothelin- $\beta$  receptor-Knockout mice. *Circulation* 2002;106:1991-1998.
  58. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, *et al.* Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998;125:813-824.
  59. Kuwaki T, Ishii T, Ju K, Yanagisawa M, Fukuda Y. Blood pressure of endothelin-3 null (-/-) knockout mice and endothelin A receptor null (-/-) knockout mice under anaesthesia. *Clin Sci* 2002; 103: 485-525.
  60. Schiffer PMH, Henrion D, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Langa-Vuves F, Van Essen H, *et al.* Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:611-616.
  61. Piderski LJ, Hedrick C, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berlinier JA, Fyfe AI. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2847-2853.
  62. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Meehan S, Springer TA, Gutiérrez-Ramos JC, *et al.* Intracellular Adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest* 1996;97:1056-1063.
  63. Dong ZM, Gutiérrez-Ramos JC, Coxon A, Mayadas TN, Wagner D. A new class of obesity genes encodes leukocyte adhesion receptors. *Proc Natl Acad Sci* .1997; 94; 7526-7530.
  64. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leucocyte rolling extravasation are severely compromised in p-selectin-deficient mice. *Cell* 1993;74:541-554.
  65. Broide DH, Humber D, Siramarao P. Inhibition of eosinophil rolling and recruitment in p-selectin- and intracellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Blood* 1998;91:2847-2856.
  66. Kakkar AK, Lefer D. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 2004 ;4:154-158.
  67. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Heirneiss C, *et al.* Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998; 17:3045-3051.
  68. Hedlund P, Aszódi A, Pfeifer A, Alm P, Hoffmann F, Ahmad M, *et al.* Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2349-2354.
  69. Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, Emanuelli C, Demonts MP, Glorioso N, *et al.* Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation* 1997; 96: 3570-3578.
  70. Monti J, Gross V, Luft FC, Milia AF, Schultz H, Dietz R, *et al.* Hübner. Expression analysis using oligonucleotide microarrays in mice lacking bradykinin type 2 receptors. *Hypertension* 2001; 38:1-3.
  71. Tilley S L, Audoly LP, Hicks E H, Kim H, Flannery PJ, Coffman TM, *et al.* Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 1999;103:1539-1545.
  72. Li DY, Faury G, Taylor D, Davis E, Boyle W, Mecham R, *et al.* Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J Clin Invest* 1998; 102: 1783-1787.
  73. Curtis S, Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor transcription and transactivation. Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2000; 2:345-352.
  74. Staprans I, Pan X, Rapp JH, Grunfeld C, Feingold



KR. Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL Receptor -and apolipoprotein E-Deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:708-714.

75. Niemann H, Kues WA. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Rep Sci* 2003;79:291-317.