

## EL TRATAMIENTO CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL CHP3R99 DISMINUYE LA INFILTRACIÓN DE MACRÓFAGOS EN LA ÍNTIMA ARTERIAL DE CONEJOS NZB.

Livan Delgado-Roche <sup>1</sup>, Emilio Acosta <sup>2</sup>, Yosdel Soto <sup>3</sup>, Yanet Hernández-Matos <sup>1</sup>, María A. Bécquer<sup>1</sup>, Dalia R. Álvarez <sup>1</sup>, Eduardo Fernández-Sánchez <sup>1</sup>, Ana M. Vázquez <sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB), Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Centro de Estudios Avanzados de Cuba, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> División de Inmunobiología, Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

Autor para correspondencia:

Dr.C. Livan Delgado-Roche.

Departamento de Farmacología. Centro de Bioproductos Marinos. Calle Loma y 37, Nuevo Vedado, Plaza de la Revolución, CP 10600, La Habana. e-mail: [livan@cebimar.cu](mailto:livan@cebimar.cu)

### Resumen

La retención de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por parte de los proteoglicanos arteriales constituye un evento molecular clave en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis. Este proceso promueve la oxidación de las LDL y con ello el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica que contribuye a la progresión de la enfermedad. En el Centro de Inmunología Molecular se obtuvo un anticuerpo monoclonal quimérico, llamado chP3R99, que reconoce proteoglicanos sulfatados de la pared arterial y es capaz de inhibir la retención y oxidación de las LDL. Además, la inmunización el anticuerpo chP3R99 previene la formación de lesiones ateroscleróticas mediante la inducción de anticuerpos autólogos anti-proteoglicanos. Sin embargo, no se conocen en su totalidad los mecanismos moleculares de acción de este anticuerpo. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inmunización con el anticuerpo chP3R99 sobre el infiltrado de macrófagos, población celular que desencadena la respuesta inflamatoria en el tejido vascular. Se llevó a cabo un esquema de inmunización preventiva, donde se administró una dosis de 100 µg s.c. del anticuerpo en conejos tratados posteriormente con 2 mL/kg i.v. de Lipofundin, un inductor de lesiones ateroscleróticas. Los resultados mostraron que el tratamiento con el anticuerpo inhibió el infiltrado de macrófagos y redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa y la actividad de la enzima mieloperoxidasa. Estos resultados demuestran la potencialidad de la inmunización con el anticuerpo chP3R99 de atenuar la respuesta inflamatoria, factor clave en el desarrollo de la aterosclerosis.

Palabras clave: Aterosclerosis, macrófagos, inflamación, anticuerpo monoclonal.

## THE TREATMENT WITH THE MONOCLONAL ANTIBODY CHP3R99 REDUCES THE MACROPHAGE INFILTRATION WITHIN ARTERIAL INTIMA OF NZW RABBITS.

### Abstract

The retention of low-density lipoproteins (LDL) by arterial proteoglycans represent a key molecular event in atherosclerosis development. This process promotes the oxidation of LDL and the development of a chronic inflammatory response, leading to atherosclerosis progression. At the Center of Molecular Immunology, it was obtained a chimeric monoclonal antibody, named chP3R99, which recognizes sulfated proteoglycans of the arterial wall, and able to inhibit the retention and oxidation of LDL. In addition, the immunization with this antibody prevents atherosclerotic lesions development by mean a generation of anti-proteoglycans autologous antibodies. Nonetheless, the molecular mechanisms of action of this antibody remain in part unknown. Thus, the present work was aimed to evaluate the effect of chP3R99 immunization on the macrophage infiltration, because of the key role of this cellular population during vascular inflammation. We carried out a preventive immunization where we administered a dose of 100 µg, s.c. in rabbits later treated with 2 mL/kg i.v. of Lipofundin, an inductor of atherosclerotic lesions. The results showed that the treatment with the chP3R99 antibody inhibited the macrophage infiltration, at the same time that reduced the gene expression of inducible nitric oxide synthase and myeloperoxidase activity. These results demonstrate the potential of chP3R99 immunization to reduce the inflammatory response, a key factor in atherosclerosis development.

Key words: Atherosclerosis, macrophages, inflammation, monoclonal antibody.

### Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) de origen aterosclerótico representan la primera causa de muerte en el mundo, y se proyecta que en 2030 morirán cerca de 25 millones de personas por esta causa (Go *et al.*, 2013). En Cuba, las ECV representan la segunda causa de muerte luego de los tumores malignos (ONEI, 2013).

La aterosclerosis es una enfermedad vascular crónica y progresiva que tiene lugar en respuesta a daños multifactoriales que se producen en la pared de los vasos sanguíneos. Dicha patología afecta las bifurcaciones de las arterias de mediano y gran calibre, comienza en la vida fetal, progresa lentamente durante la niñez y la adolescencia, y su desarrollo se acelera durante la adultez (Buono *et al.*, 2005). Es conocido que la inflamación desempeña un papel importante en el inicio y desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Moore y Tabas, 2011).

La retención de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los proteoglicanos (PG) en la matriz extracelular (MEC) y su posterior oxidación por parte de las especies reactivas del oxígeno (ERO) promueve la infiltración de macrófagos hacia la íntima arterial y la formación de células espumosas, lo

cual da origen a la estría grasa, primera manifestación morfológica de lesión aterosclerótica. Reportes de la literatura plantean que la activación de macrófagos Ly-6C<sup>+</sup> en el espacio subendotelial contribuye a perpetuar la respuesta inflamatoria y a la progresión de la lesión aterosclerótica (Moore y Tabas, 2011).

El anticuerpo monoclonal (AcM) quimérico chP3R99, de isotipo IgG1, es una variante mutada del AcM murino P3, obtenido en el Departamento de Ingeniería de Anticuerpos del Centro de Inmunología Molecular (Fernández-Marrero *et al.*, 2011). Este anticuerpo reconoce glucosaminoglicanos sulfatados (GAG) presentes en los PG, especialmente al condroitín sulfato (CS). Recientemente, nuestro grupo demostró la capacidad del AcM chP3R99 y de los anticuerpos inducidos por la inmunización con dicho AcM de inhibir la unión de las LDL a los GAG. Además, se demostró que el tratamiento preventivo con el AcM chP3R99 evitó la formación de lesiones ateroscleróticas en conejos NZB y en ratones deficiente de apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>). Este efecto antiaterogénico estuvo asociado, en ambos biomodelos, a la inducción de anticuerpos anti-CS capaces de inhibir la unión de las LDL al CS (Soto *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2012) y a la reducción del estrés oxidativo aórtico (Delgado-Roche *et al.*, 2013). No obstante, se desconocía el efecto del tratamiento con el chP3R99 sobre el infiltrado de macrófagos, población celular estrechamente relacionada con el inicio y desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de macrófagos en lesiones ateroscleróticas de conejos NZB y el potencial efecto inhibitorio de la inmunización con el AcM chP3R99.

## **Materiales y métodos**

### Biomodelo

Conejos NZB machos (n=40) de 12 semanas de edad con un peso comprendido entre 2,0-2,5 kg, obtenidos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB; Mayabeque, Cuba). Los animales se mantuvieron a una temperatura de 26 ± 2°C, una humedad relativa entre 50-70% y un ciclo de luz-oscuridad de 12h, con libre acceso a los alimentos y agua. Todos los procedimientos se realizaron según lo establecido por la unidad de gestión de la calidad (UGC) del CEIEB y el Comité de Ética para el uso y cuidado de animales de experimentación del CIM.

### Composición del Lipofundin

El Lipofundin MCT/LCT 20%® (Braun Melsungen, Alemania) es una emulsión de lípidos que contiene: 100 g de aceite de soya, 100 g de triglicéridos de cadena media/triglicéridos de cadena larga (MCT/LCT), 25 g de glicerol, 12 g de lecitina de huevo, 170 ± 40 mg de α-tocoferol y el vehículo oleato de sodio/agua para inyección cantidad suficiente para 1000 mL.

### Anticuerpos utilizados en el estudio

Los transfectomas productores de los AcMs chP3R99 y hR3, ambos de isotipo IgG1, fueron cultivados en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. Los mismos fueron purificados a partir de los sobrenadantes de cultivo de los transfectomas mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de Proteína A sefarosa y analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. La especificidad de los anticuerpos purificados se confirmó mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) y citometría de flujo. La concentración proteica se estimó a 280 nm. El AcM humanizado hR3 reconoce el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Mateo de Acosta *et al.*, 1997) y fue utilizado en el estudio como control de isotipo. El anticuerpo comercial RAM-11 (Dako, Estados Unidos) detecta antígenos de superficie de macrófagos de conejo y fue utilizado en los experimentos de inmunohistoquímica.

### Inducción de la aterosclerosis

La inducción de lesiones ateroscleróticas se llevó a cabo mediante la administración i.v. de 2 mL/kg de Lipofundin por la vena marginal de la oreja, en forma de infusión lenta durante 1-2 min. Este procedimiento se realizó diariamente durante 8 días consecutivos (Jellinek *et al.*, 1982; Noa *et al.*, 1992).

### Esquema de inmunización

Los conejos fueron divididos en 4 grupos experimentales (n=10). Los del primer y segundo grupo se trataron con 100 µg de los AcMs chP3R99 y hR3 en 500 µL de PBS, respectivamente, por vía s.c. a ambos lados del lomo del animal (250 µL/sitio), una vez a la semana durante tres semanas consecutivas. Posterior a la última administración de los AcMs, se administró el Lipofundin para inducir la formación de lesiones ateroscleróticas según fue descrito anteriormente. Como grupo control de la enfermedad, los animales del tercer grupo recibieron una inyección s.c. de PBS, mientras que el cuarto grupo fue asumido como el control sano. Al final del experimento (día 23), los conejos fueron anestesiados con 5 mg/kg i.v. de ketamina HCl (Liorad, La Habana, Cuba) y sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg, i.v.) (México SA de CV, México).

### Análisis histopatológico

Las muestras de tejido se obtuvieron a partir del extremo proximal del arco de la aorta, a nivel de las válvulas aórticas, por ser las áreas más susceptibles al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Las muestras se fijaron en una solución neutra de formaldehído al 10% durante 24 h. Posteriormente, se deshidrataron en grados crecientes de alcohol y xilol en un procesador de tejidos (Sakura, Japón).

Seguidamente se procedió a la inclusión en parafina (Sigma). Se realizaron diez cortes por muestra con un grosor de 5  $\mu\text{m}$  (Micrótomo Leica, Houston, Estados Unidos) y se montaron en láminas con cubreobjetos mediante el empleo de aceite de montaje (Dako). El análisis cualitativo de las lesiones ateroscleróticas se realizó mediante la técnica de coloración de la hematoxilina/eosina.

#### Inmunodetección de macrófagos en aortas de conejos

Las muestras de aortas, previamente incluidas en parafina fueron cortadas en segmentos de 5  $\mu\text{m}$ , desparafinizadas y rehidratadas. Posteriormente se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con reactivo de bloqueo Power Block-Universal (Jackson, Estados Unidos) durante 5 min. Para la detección de macrófagos las muestras fueron incubadas con el anticuerpo RAM-11 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 30 min. Las láminas fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo de cabra anti-conejo biotilado (1:400, Jackson). Luego de tres pasos de lavados con PBS-Tween 20%, la reacción se reveló con el sustrato diaminobenzidina (DAB) (Dako) y contrastada con hematoxilina (Dako).

#### Determinación de marcadores de activación de macrófagos

##### Actividad de la enzima mieloperoxidasa

La actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) fue determinada según el método descrito por Klebanoff y Clark (1978). El tejido aórtico se homogenizó durante 10 min en PBS (50 mM, pH=6,0) a una proporción de 1:20 (m/v). Posteriormente se centrifugó a 5000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en PBS y se agitó en vibroagitador durante 1 min, luego se centrifugó nuevamente. Este procedimiento de lavados fue repetido 3 veces. El sedimento final fue resuspendido en 1 mL del detergente bromuro de hexadecil-trimetilamonio (Sigma) al 0,5% y se incubó en cámara fría a 4°C durante 20 min. Posteriormente se centrifugó a 15 200 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue utilizado para el ensayo. A 940  $\mu\text{L}$  del reactivo o-dianisidina- $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma), se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se midió el cambio de D.O. tras 1 min de reacción a 460 nm, correspondiente a la actividad enzimática.

##### Cuantificación de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible por RT-qPCR

Las muestras de tejido aórtico fresco (3 mg) fueron homogenizadas en 350  $\mu\text{L}$  de solución de lisis (Qiagen, Reino Unido) y 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol a una frecuencia de 20 Hz durante 2 min a 4°C en un homogenizador de tejido (Tissue Lyser II, Qiagen). El ARN total contenido en el homogenado fue extraído según las indicaciones del fabricante del kit comercial RNeasy Plus Micro (Qiagen). El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado a partir del ARN total mediante el uso del kit comercial Quantitect Reverse Transcription (Qiagen). Se utilizó como control interno el gen constitutivo gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El ADN genómico contaminante fue removido según las indicaciones del fabricante, no obstante, se incluyeron controles del experimento sin la enzima reverso transcriptasa para descartar la presencia de ADN genómico.

Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados según las secuencias de ADNc disponibles en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La secuencias utilizadas fueron las siguientes:

Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS):

5'-GCCAGACCAAACCTGTGTGCC-3';

3'-GTGAGGGCTTGCCTGAGTGA-5'

GAPDH:

5'-CCGTTGCTGTCGCCCGTT-3';

3'-CGGCCAAATCCGTTCACTCC-5'.

La medición específica de los niveles de ARN mensajero (ARNm) correspondientes a los genes de la iNOS y el GAPDH se llevó a cabo en el equipo LightCycler (Bio Rad Inc., EUA). Cada muestra se analizó por duplicado. La cuantificación de los niveles de ARNm se llevó a cabo por el método  $\Delta\Delta CT$  y el análisis estadístico, específico para este experimento, se realizó mediante el programa computacional REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

#### Procesamiento estadístico

Primeramente se calculó la media y la desviación estándar (DE) de las diferentes variables. En todos los casos, los valores se analizaron por triplicado y los experimentos se realizaron al menos dos veces. Los valores de media y DE fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0. La normalidad de los datos experimentales fue analizada mediante la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. Para determinar diferencias entre los grupos, en el caso de las variables que seguían una distribución normal, se realizó una comparación múltiple de medias a través de un ANOVA de clasificación simple seguido de la prueba de Bonferroni. Para aquellas variables que no cumplían con este requisito se analizaron por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y Dunn. El nivel de significación estadística, empleado en todos los casos, fue de  $p < 0,05$ . Los datos fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 18.0.

### **Resultados**

Para determinar los efectos de la inmunización con el AcM chP3R99 sobre la formación de lesiones ateroscleróticas, se analizaron las secciones del extremo proximal del arco aórtico coloreadas con hematoxilina/eosina.

Las aortas de conejos del grupo control sano mostraron una morfología normal de las diferentes capas de la pared arterial (figura 1C). Mientras que la infusión i.v. de Lipofundin indujo la formación de lesiones ateroscleróticas aórticas en todos los conejos del grupo control de la enfermedad y en aquellos inmunizados con el AcM hR3 (figuras 1A y 1B). En estos animales, las lesiones se caracterizaron por un engrosamiento de la túnica íntima y el ensanchamiento de los espacios extracelulares, así como una desorganización de la morfología vascular. Se observó además

migración de células del músculo liso vascular (CMLV) desde la túnica media hacia la íntima arterial. En cambio, la inmunización con el AcM chP3R99 previno la formación de lesiones ateroscleróticas en 4 conejos, mientras que solo pequeñas lesiones se observaron en los restantes animales inmunizados con este anticuerpo (figura 1D).

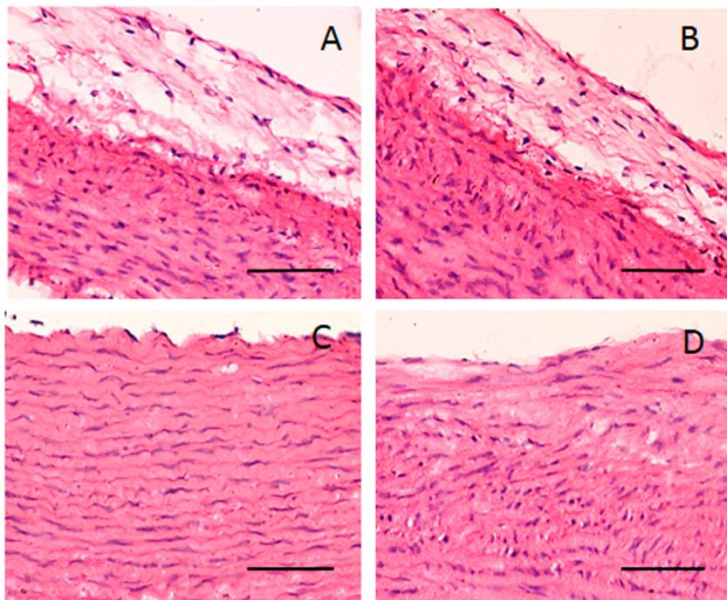


Figura 1. Efecto antiaterosclerótico del tratamiento preventivo con el AcM chP3R99 en conejos NZB. Los AcMs fueron administrados por vía s.c. (100  $\mu$ g en 500  $\mu$ L de PBS), 3 inyecciones a intervalos semanales, antes de la administración i.v. de 2 mL/kg de Lipofundin durante 8 días. La tinción con hematoxilina/eosina muestra un engrosamiento de la túnica íntima de las aortas de conejos del grupo control de la enfermedad (A) y los tratados con el AcM hR3 (B) con ensanchamiento de los espacios extracelulares y migración de células musculares lisas. En los animales inmunizados con el AcM chP3R99 solo se observan pequeñas lesiones (C), mientras que las aortas de los animales que no recibieron el Lipofundin poseen una morfología normal de la pared arterial, sin engrosamiento de la íntima ni distorsión de la arquitectura vascular (D). Magnificación 40X, barra: 50  $\mu$ m.

Dada la activa participación de los macrófagos en el inicio y desarrollo de la enfermedad (Corrêa *et al.*, 2011), se evaluó la potencialidad del tratamiento con el AcM chP3R99 de reducir el infiltrado de esta población celular hacia la íntima arterial. Los resultados mostraron una fuerte inmuno-reactividad del anticuerpo RAM-11 en los conejos tratados con PBS o el AcM hR3 previo a la administración de Lipofundin (figuras 2A y 2B). Por el contrario, en las aortas de animales inmunizados con el AcM chP3R99 no se observó marcaje del AcM RAM-11 (figura 2D), semejante al grupo control sano (figura 2C), indicativo de una prevención de la infiltración de macrófagos hacia la íntima arterial.

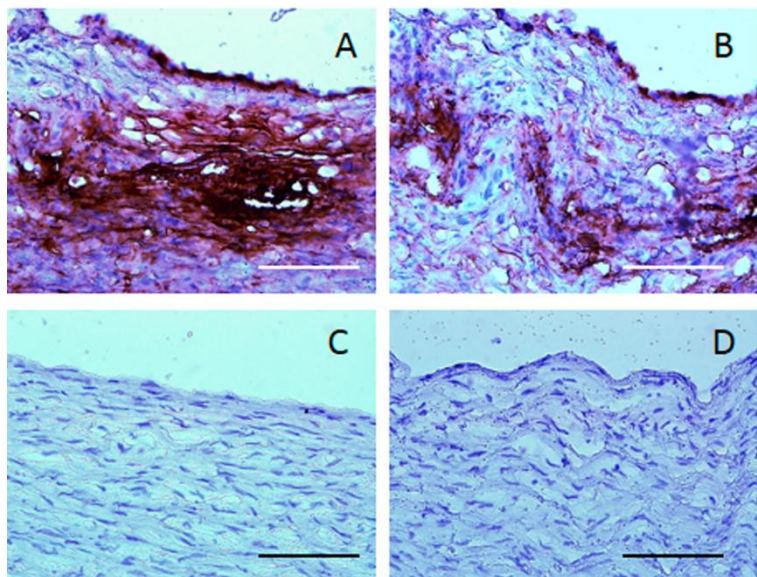


Figura 2. Efecto del tratamiento preventivo con el AcM chP3R99 sobre la infiltración de macrófagos en la pared arterial en conejos. La tinción con el AcM RAM-11 (10 µg/mL) evidenció la infiltración de macrófagos en aortas de conejos a los que se administró PBS (A) o el AcM hR3 (B) previo a la administración de Lipofundin. En las aortas de conejos tratados con el AcM chP3R99 (C) y los animales controles sanos no se observa infiltrado de macrófagos. Magnificación 20X, barra: 50 µm.

Como marcadores de la activación de macrófagos se determinó el nivel de expresión de la enzima iNOS y la actividad de la enzima MPO; y se evaluó el efecto de la inmunización con dicho anticuerpo sobre estos componentes de la respuesta inflamatoria. En los animales tratados con PBS previo a la administración de Lipofundin se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de los niveles de ARNm de la enzima iNOS, mientras que la inmunización con el AcM chP3R99 redujo los niveles de transcritos primarios de esta enzima (figura 3A). Por otra parte, la actividad de la MPO aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los animales que recibieron PBS o el AcM hR3 previo a la administración de Lipofundin. Por el contrario, en los conejos inmunizados con el chP3R99 se observó una menor actividad de esta enzima (figura 3B).

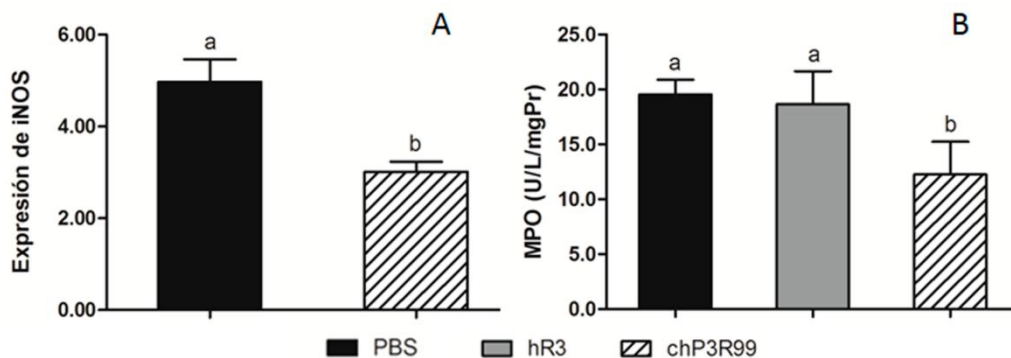


Figura 3. Efecto del tratamiento con el AcM chP3R99 sobre la expresión transcripcional de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (panel A) y la actividad de la enzima mieloperoxidasa (panel B) en el tejido aórtico de conejos NZB. Los niveles de expresión de ARNm de la proteína de interés fueron normalizados contra los niveles de ARNm de GAPDH. La actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) se determinó en muestras de tejido aórtico. Las barras representan la media  $\pm$  DE de los valores experimentales y letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ; REST software y Kruskal-Wallis y Dunn, respectivamente).

### Discusión

Previamente nuestro grupo demostró que las lesiones ateroscleróticas provocadas por la administración i.v. de Lipofundin son similares a las lesiones de tipo IV que se producen en el humano (Acosta *et al.*, 2012). Según esta clasificación, que va desde la formación de la estría grasa (lesión tipo I) hasta el desarrollo de lesiones complicadas con la formación de trombos y hemorragias (lesión tipo VI) (Stary *et al.*, 2000), el Lipofundin genera ateromas con núcleos lipídicos extracelulares bien definidos, lo cual es característico de este estadio de la enfermedad en el humano. Además, se demostró previamente que la inmunización con el AcM chP3R99 previene la formación de lesiones a nivel del arco aórtico (Soto *et al.*, 2012), resultado que se confirmó en el presente trabajo. No obstante, no se conocía el efecto de dicha inmunización sobre el infiltrado de macrófagos hacia la íntima arterial, así como sobre dos marcadores de activación de dichas células, como son la expresión de la enzima iNOS y la actividad de la MPO.

El análisis inmunohistoquímico mostró que la formación de lesiones en conejos estuvo caracterizada por una marcada infiltración de macrófagos en el espacio subendotelial. La inhibición de la migración de estas células fagocíticas ha sido considerada una estrategia para evitar la progresión de la aterosclerosis, ya que de esta forma se reduce la formación de células espumosas y la inflamación (Tabas, 2010; Moore y Tabas, 2011). Reportes de la literatura demostraron que la disminución del infiltrado de macrófagos proinflamatorios (Ly-6C+) trajo consigo una reducción del número de células espumosas, así como del tamaño de las lesiones ateroscleróticas en ratones apoE<sup>-/-</sup> (Ley *et al.*, 2011). Coherentemente con estos reportes, en el presente estudio se observó que la disminución de esta población celular en la pared arterial de conejos inmunizados con el AcM chP3R99 estuvo asociado con una menor formación de lesiones ateroscleróticas a nivel del arco aórtico.

A su vez, la reducción del infiltrado de macrófagos en las aortas de los conejos inmunizados con el anticuerpo chP3R99 coincidió con una menor actividad de la enzima MPO en el tejido aórtico. La actividad de esta enzima constituye una de las fuentes fundamentales de ERO en la pared vascular (Ronald *et al.*, 2009). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la MPO co-localiza con la proteína C reactiva, por lo que el aumento de su actividad ha sido considerado un marcador de

inflamación (Ferrante *et al.*, 2010). Por otra parte, la MPO es capaz de unirse a la apoAI y generar in situ especies oxidantes como el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}^-$ ) (Peng *et al.*, 2008), afectando las propiedades antiaterogénicas de las HDL, e incluso tornándolas no funcionales (Shao *et al.*, 2012). En lipoproteínas de alta densidad (HDL) provenientes de individuos cardiopatas con altos niveles de expresión de la enzima MPO se han detectado elevadas concentraciones de clorotirosina y grupos carbonilos (Zheng *et al.*, 2005). Por el contrario, estudios poblacionales han demostrado que la deficiencia total o parcial de dicha enzima en humanos se relaciona con una menor susceptibilidad al padecimiento de enfermedades coronarias (Ronald *et al.*, 2009).

Por otra parte, el tratamiento con el AcM chP3R99 redujo los niveles de expresión de la enzima iNOS en el tejido aórtico, lo cual estuvo asociado a la menor presencia de lesiones ateroscleróticas en los conejos inmunizados con este anticuerpo. Antecedentes de la literatura reportan que la actividad de la iNOS se correlaciona con elevados niveles de LDL oxidadas y proteínas nitradas en modelos animales de aterosclerosis (Liu *et al.*, 2008). En cambio, una menor expresión de la iNOS ha sido asociada a la preservación de la función endotelial, así como a la reducción de lesiones ateroscleróticas en ratones apoE<sup>-/-</sup> (Bronas y Dengel, 2010).

Los resultados del presente trabajo demuestran que los efectos antiateroscleróticos de la inmunización con el AcM chP3R99 está mediado, en parte, por la inhibición de la infiltración de macrófagos y su posterior activación en la íntima arterial. En trabajos futuros se recomienda evaluar el efecto de dicho anticuerpo sobre marcadores de inflamación y correlacionarlos con los resultados obtenidos en la presente investigación. Los resultados obtenidos, en conjunto, contribuyen a elucidar los mecanismos moleculares de acción de esta nueva estrategia terapéutica, no explorada con anterioridad.

### **Agradecimientos**

Los autores desean agradecer el financiamiento del Centro de Inmunología Molecular para el desarrollo de esta investigación, así como la asistencia técnica de Milagros Frómata y José Alberto Medina.

### **Literatura citada**

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Betty JD, Borden WB, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2013 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127:E6-E245.
2. Oficina Nacional de Estadísticas e Información (ONEI). Salud Pública y Asistencia Social. Tasas de las principales causas de muerte 2012. Disponible en: [http://www.onei.org.pe/aec2011/esp/20080618\\_tabla\\_cuadro.htm](http://www.onei.org.pe/aec2011/esp/20080618_tabla_cuadro.htm). Consultado: 7 de febrero de 2014.

3. Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH, Lichtman AH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigenspecific immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1596-1601.
4. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011;29:341-355.
5. Fernández-Marrero Y, Hernández T, Roque-Navarro L, Talavera A, Moreno E, Griñán T, et al. Switching on cytotoxicity by a single mutation at the heavy chain variable region of an anti-ganglioside antibody. *Mol Immunol* 2011;48:1059-1067.
6. Soto Y, Acosta E, Delgado L, Pérez A, Falcón V, Bécquer MA, et al. Antiatherosclerotic effect of an antibody that binds to extracellular matrix glycosaminoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:595-604.
7. Brito V, Mellal K, Giroux S, Pérez A, Soto Y, de Blois D, et al. Induction of anti-anti-idiotypic antibodies against sulfated glycosaminoglycans reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2847-2854.
8. Delgado-Roche L, Acosta E, Soto Y, Hernández Y, Olivera A, Fernández E, Vázquez AM. The treatment with an anti-glycosaminoglycan antibody reduces aortic oxidative stress in a rabbit model of atherosclerosis. *Free Radic Res* 2013;47:309-315.
9. Mateo de Acosta C, Moreno E, Amour K, Lombardero J, Harris W, Pérez R. Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology* 1997;3:71-81.
10. Jellinek H, Harsing J, Fuzcesi S. A new model for arteriosclerosis. An electron microscopy study of the lesions induced by i.v. administered fat. *Atherosclerosis* 1982; 43:7-18.
11. Noa M, Más R. Ateromixol y lesión ateroesclerótica en conejos inducida por Lipofundin. *Prog Cien Med* 1992;6:14-19.
12. Klebanoff SJ, Clark FA. The neutrophil: function and clinical disorders, 1. Amsterdam, Holanda. Elsevier/North Holland Biomedical Press;1978. p. 810.
13. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res* 2002;30:36.
14. Corrêa CR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Latória S, Soares AMVC. Activation of monocytes and cytokine production in patients with peripheral atherosclerosis obliterans. *J Inflamm* 2011;8:23-30.
15. Acosta E, Delgado L, Bécquer MA, Falcón V, Noa M, Álvarez D, et al. Histopathological and ultrastructural characterization of lipofundin-induced atherosclerotic lesions in rabbits. *Acta Microscópica* 2012;21:119-131.

16. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1177-1178.
17. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* 2010;10:36-46.
18. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1506-1516.
19. Ronald JA, Chen JW, Chen YC, Hamilton AM, Rodríguez E, Reynolds F, et al. Enzyme-sensitive magnetic resonance imaging targeting myeloperoxidase identifies active inflammation in experimental rabbit atherosclerotic plaques. *Circulation* 2009;120:592-599.
20. Ferrante G, Nakano M, Prati F, Niccoli G, Mallus MT, Ramazzotti V, et al. High levels of systemic myeloperoxidase are associated with coronary plaque erosion in patients with acute coronary syndromes: A clinicopathological study. *Circulation* 2010;122:2505-2513.
21. Peng DQ, Brubaker G, Wu Z, Zheng L, Willard B, Kinter M, et al. Apolipoprotein A-I tryptophan substitution leads to resistance to myeloperoxidase-mediated loss of function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2063-2070.
22. Shao B, Pennathur S, Heinecke JW. Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions. *J Biol Chem* 2012;287:6375-6386.
23. Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, et al. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem*. 2005;280:38-47.
24. Liu VWT, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: A review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 2008;77:19-29.
25. Bronas UG, Dengel DR. Influence of vascular oxidative stress and inflammation on the development and progression of atherosclerosis. *Am J Life Med* 2010;4:521-534.