

CINÉTICA EN ESTADO DE ENFERMEDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL QUIMÉRICO P3: MODELO ANIMAL DE ATEROSCLEROSIS

Eduardo Fernández-Sánchez ¹, Livan Delgado-Roche ¹, María de los A. Becquer ¹ Emilio Acosta ¹, Geomar Acuña ², Gledys Reinaldo², Leyanis Rodríguez ² Niurys de Castro ² Ana M. Vazquez ³.

¹ Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

² Departamento de Farmacología y Toxicología, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Cuba.

³ Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba.

A quién dirigir correspondencia:

Dr.C. Eduardo Fernández-Sánchez. Jefe del Laboratorio de Farmacocinética, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. email: efernandez@ifal.uh.cu

Resumen

Entre los objetivos de la Farmacocinética se encuentra el determinar como los estados de enfermedad inciden en los parámetros característicos, posibilitando la explicación de mecanismos asociados o no a la respuesta farmacológica esperada. La aterosclerosis se caracteriza por un incremento de los proteoglicanos expresados en el daño a la intima arterial, y el conejo Nueva Zelanda ofrece la posibilidad de diseñar un modelo de enfermedad. En el presente trabajo se utilizó el modelo de Lipofundin[®]. Dado que el AcM murino P3 presenta interacción con los proteoglicanos y como tal centra una estrategia de aplicaciones terapéuticas para la aterosclerosis mediante el diseño de novedosas estructuras quimérica a partir de este AcM, ello fundamenta que en el presente trabajo su objetivo sea el estudiar la farmacocinética en animales sanos y enfermos, mediante la comparación estadística de sus parámetros característicos CL, V_{SS}, t_{1/2}, AUC y MRT, posterior a una administración *bolus* endovenoso de 2 mg/Kg de AcM quimérico P3. Para evaluar la efectividad del modelo utilizado se midieron los biomarcadores de colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y óxido nítrico, y paralelamente se realizaron las determinaciones histopatológicas a grupos paralelos que fueron sacrificados para tales fines. Mediante los respectivos ensayos de t-Student con respectivas significancias de p<0.01 para los biomarcadores y p<0.05 para el resultado farmacocinético, se comprueba la efectividad del modelo utilizado de Lipofundin[®] por sus cambios significativos de los biomarcadores y la no variación de los parámetros farmacocinéticos, por lo que se concluye que la enfermedad no afecta el transcurso farmacocinético del AcM quimérico P3.

Palabras clave: Anticuerpo monoclonal quimérico P3, farmacocinética, cinética en estado de enfermedad, N- glicolil asociado a gangliósidos, modelo experimental de enfermedad de aterosclerosis.

KINETICS ON STATE DISEASE OF THE CHIMERIC MONOCLONAL ANTIBODY P3: ANIMAL MODEL OF ATHEROSCLEROSIS

Abstract

The scope of the pharmacokinetic studies include to establish how the disease state influence in the pharmacokinetic behavior, allowing to explain how it participate on the pharmacological response. In atherosclerosis there is a over expression of the proteoglicanos associated to the injury on the aortic intima, and the New Zealand rabbit offers a possibility of the design of an experimental model of the disease. In the present paper it used the Lipofundin® model. Due that the chimeric monoclonal antibody P3 shows a determinate interaction with the proteoglicanos, and at the present there is a research strategy for the developing of new chimeric structure corresponding to the native P3 to be apply in the therapeutical alternatives for atherosclerosis, in the present paper it study the pharmacokinetics of the chimeric monoclonal antibody P3, in both groups of animals: health and ill, using the statistical comparison of the changes in the characteristic parameters: CL, V_{SS} , $t_{1/2}$, AUC and MRT. To evaluate the animal model of disease, it was made the comparison of the correspondent biomarkers: cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and nitric oxide. Parallel it was made and histopatological study on the aortic intima of another groups of animal, at the same time than the pharmacokinetic experiment. Statically was applied Student t-test for the biomarkers with a significance level of $p < 0.01$, and a significance level of $p < 0.05$ for the pharmacokinetic experiment. It concludes that the pharmacokinetic parameters were no altered with the disease, so will be the same expected pharmacological response.

Key words: chimeric monoclonal antibody P3; pharmacokinetics, kinetics on state disease, N-glycolyl-containing-gangliosides, atherosclerosis experimental disease model.

Introducción

Una de las cualidades poco aprovechadas de los estudios farmacocinéticos es que los mismos pueden ser utilizados para explicar las incidencias de las enfermedades en el comportamiento farmacocinético y de hecho redundando en las respuestas farmacológicas y con ello poder predecir las posibles aplicaciones clínicas, desde el sustento de las investigaciones pre clínicas inclusive. En este sentido, significativa fue la línea desarrollada por Gerhard Levy a partir de 1977 ¹ basada en estudios en estados de enfermedad, aprovechando los modelos en animales de experimentación ^{2, 3, 4,} ⁵ lo cual estableció una metodología paradigmática combinando los enfoques farmacocinéticos, farmacodinámicos y clínicos.

Aunque la mayoría de estos mas de 50 trabajos que cubrieron variadas enfermedades ^{6, 7, 8} fueron realizados a partir de moléculas de origen sintético, también los productos biotecnológicos encuentran

sus posibilidades, cuestión esta que se enfocó en los estudios combinados del AcM murino anti EGF-R denominado ior egf/r3, los que permitieron establecer una determinación de la dosis biológicamente óptima a emplear en los estudios clínicos del AcM humanizado hR3^{9, 10, 11}.

El anticuerpo monoclonal murino P3, demostró su reconocimiento por los glicolípidos sulfatados y los proteoglicanos¹², aunque su variante quimérica no la manifiesta con igual intensidad pero su identificación si ha posibilitado a través de la Ingeniería Genética, el diseño de novedosas estructuras derivadas para alcanzar las propiedades requeridas que inciden en una estrategia clínica orientadas hacia las alternativas terapéuticas a emplear en el tratamiento de la aterosclerosis. Cada año se incrementa el número de investigaciones que determinan el carácter autoinmune de las enfermedades, entre ellas la propia aterosclerosis. Ello ha definido novedosos conceptos terapéuticos que utilizan los mecanismos idiotípicos de diversos anticuerpos, para generar anticuerpos naturales que contrarresten la enfermedad^{13, 14}.

La aterosclerosis entre sus variadas manifestaciones clínicas, presenta daño progresivo a la aorta, con engrosamiento de la intima arterial, entre cuyos componentes permanentes se encuentran los proteoglicanos. Igualmente la enfermedad se manifiesta en altas concentraciones de colesterol en plasma, y de lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL), producto de la formación de la lesión aterosclerótica¹⁵.

Los animales de laboratorio han sido utilizados extensivamente en las investigaciones biomédicas. Entre ellos el conejo Nueva Zelandia ha participado en un gran número de estudios que tratan con la aterosclerosis, especialmente a través de métodos que incorporan la dieta alimentaria¹⁶. Utilizando el modelo de enfermedad inducida por la administración del Lipofundin[®], un suplemento nutricional parenteral ampliamente empleado en la práctica hospitalaria, varios autores estudiaron el efecto protector del policosanol sobre las lesiones ateroscleróticas en conejos^{17, 18}.

Todas estas cuestiones anteriormente expuestas, han conformado la racional que el presente trabajo se oriente hacia el estudio de cómo la farmacocinética del AcM quimérico P3, se modifica o no en presencia de la enfermedad aterosclerosis, y de ahí inferir algunos criterios que puedan aportar acerca de las consecuencias farmacodinámicas que de ello se derive.

Materiales y Métodos

Producto ensayado:

El anticuerpo monoclonal quimérico P3 fue obtenido en los laboratorios del Centro de Inmunología Molecular (CIM) de Ciudad de La Habana a través de técnicas de ingeniería de anticuerpos a partir del AcM P3 murino y mantuvo sus principales propiedades de reconocimiento, reaccionando específicamente con NeuGcGM3 y NeuGcGM2, pero no con sus variantes acetiladas¹².

El producto ensayado fue formulado como solución inyectable teniendo en cuenta las Buenas Prácticas de Producción establecidas en los Procedimientos Normalizados de trabajo de dicha institución.

Animales de experimentación:

Para el modelo de enfermedad y ensayo farmacocinético: Se utilizaron 8 conejos Nueva-Zelanda (NZ) machos, de 6 a 8 semanas de nacidos, cuyos pesos promedios oscilaron alrededor de 1.84 Kg aproximadamente. Estos animales fueron suministrados por el Centro Nacional Para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), y fueron alojados en el bioterio del Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB) del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana, en correspondencia con los Procesos Normalizados de Operación (PNO) establecidos, con un período de adaptación de 7 días. Durante el tiempo que duró el experimento se garantizaron las condiciones de temperatura (20-22°C), humedad (50%), foto-período (12x12), alimentación (150g/d) y consumo de agua *ad libitum*, requeridas en estos casos para lograr el bienestar de los animales.

Los animales fueron divididos en dos grupos de 4, uno para los conejos sin tratamiento de Lipofundin® y otro grupo para los conejos tratados con Lipofundin®, todos identificados con su correspondiente tarjeta de datos que incluyó; fecha de inicio, fecha de muestreos, observaciones, etc. Todos los animales fueron destinados al ensayo farmacocinético al finalizar los tratamientos a los 8 días.

Para el análisis histológico se conformó un grupo de tres conejos, de un peso promedio alrededor de 1.92 Kg., los cuales recibieron el tratamiento con Lipofundin® y a las 8 semanas fueron sacrificados para analizar el daño en la aorta.

Modelo de aterosclerosis:

La aterosclerosis experimental se produjo según lo reportado por L. Delgado en 2012¹⁹ con Lipofundin® MCT/LCT 20% (Luxembourg Pharmaceutical Ltd, Germany), mediante una inyección lenta de 2 mL/Kg del producto, alrededor de 1- 2 min. Este procedimiento fue repetido durante un período de 8 días, y al final de ello se tomaron muestras de sangre para medir los parámetros sanguíneos: colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL y óxido nítrico.

Las concentraciones séricas de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL, se midieron enzimáticamente utilizando los juegos de reactivos comerciales de Random Crumlin, UK.

El óxido nítrico se cuantificó mediante la técnica indirecta de nitritos/nitratos ($\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$) de acuerdo a la reacción de Griess, de inicio convirtiendo los nitratos a nitritos usando nitrato reductasa (Boehringer Mannheim Italy SpA, Milan, Italia). El reactivo de Griess (1% de sulfanilamida, 0.1% de N-(1-naftiletildiamina dihidroclorico en 0.25% de ácido fosfórico) se añadió. Las muestras se

incubaron a la temperatura ambiente durante 10 min y la absorbancia fue medida a 540 nm, utilizando un equipo de lector de microplaca (SUMA, Centro de Inmunoensayo, Cuba).

Procedimiento Histológico:

Se utilizaron dos grupos de 3 conejos, uno de esos grupos se mantuvieron en estado sano, y el otro se sometieron a los mismos tratamiento de los conejos destinados al ensayo farmacocinético en estado de enfermedad. Después de 8 días, los animales fueron sacrificados utilizando una sobredosis de pentotal sódico. Fragmentos de 5 cm entre el arco aórtico y la aorta torácica, fueron removidos quirúrgicamente, limpiados de tejido circundante y de sangre con agua deionizada y cortados transversalmente para el análisis histológico.

Procedimiento Histopatológico:

Tres muestras de la aorta de cada animal se tomaron y fijaron en formalina neutra al 10%, embebida en parafina y teñida con hematoxilina-eosina. La evaluación histológica consideró el daño endotelial y el espesor de la región de la íntima.

Ensayo farmacocinético:

En ambos grupos, animales sin tratamiento (sanos) y con tratamiento de Lipofundin® (enfermos) se administró un *bolus* endovenoso por la vena marginal de la oreja, de una dosis de 2 mg/Kg de AcM quimérico P3 al finalizar los 8 días previstos para el tratamiento promotor de la enfermedad. Posterior a la administración se tomaron muestras de sangre por la vena marginal opuesta a la de la inyección, a los tiempos de 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 horas

Todos los animales se sometieron a un régimen de ayuno desde la noche anterior al experimento hasta dos horas después de la administración del fármaco. Se les permitió la toma de agua *ad libitum* antes y durante todo el tiempo que duró el estudio. Todos los animales fueron manipulados bajo la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales, de acuerdo a las instrucciones del Internacional Animal Care Comité (ARCA No. 0112/2000) y en correspondencia con las European Guidelines for Animal Experimentation. Todos los procesos invasivos se condujeron bajo ligera anestesia de fenobarbital sódico (40 mg/Kg).

La sangre recolectada en cada muestreo fue transferida a tubos colectores, donde se mantuvieron durante 1 hora aproximadamente hasta que ocurriera la retracción espontánea del coágulo. Posteriormente se obtuvo el suero mediante desgarramiento con un tubo capilar del coágulo formado y centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos. El suero así obtenido, se refrigeró a -20°C hasta su posterior cuantificación.

Cuantificación de la concentración sérica de AcM quimérico P3.

La cuantificación de los niveles séricos del AcM quimérico P3 se realizó mediante el empleo de una técnica ELISA de tipo Sandwich, desarrollada y validada en el CIM. Esta técnica tiene una

sensibilidad de 2 ng/mL y una exactitud del 10 %. Para su desarrollo se recubrieron placas de poli estireno de 96 pocillos (MaxiSorp, NUNC) con 50 µL/pozo de anti-IgG humana obtenida en carnero (SIGMA I-3382) a una concentración de 3 µg/mL de tampón carbonato-bicarbonato. Posteriormente se incubaron durante 12 horas en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se lavó cada placa 3 veces con agitación usando solución de lavado (tween 20 en PBS 1x, al 0,05 %).

Se desarrolló una Curva de Calibración partiendo de una concentración de IgG humana (SIGMA I-2511) de 250 ng/mL y realizando diluciones sucesivas 1:2 sobre solución de ensayo (solución de BSA en PBS 1x al 0,1 %) para obtener las concentraciones: 125, 62.5, 31.25, 15.6 y 0 ng/mL

Las diluciones de las muestras se realizaron utilizando solución de ensayo. Las diluciones de las muestras correspondientes a los tiempos de muestreo comprendidos entre 5 minutos y 8 horas fueron de 1/400 y 1/800, las diluciones de las muestras restantes fueron de 1/100 y 1/200.

Se aplicó la curva de calibración en los pocillos correspondientes y las diluciones por duplicado, ubicando todas las muestras de un conejo en una sola placa. Luego se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C, y posteriormente se lavaron 3 veces con solución de lavado.

Se aplicó el conjugado anti-IgG humana fosfatasa alcalina a una dilución de 1/10000 en solución de ensayo y se incubó durante una hora a 37°C, en cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación, se lavó 3 veces con solución de lavado y se aplicó el sustrato, pNPP disuelto en tampón dietanolamina al 0,1 %. Se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y luego se detuvo la reacción enzimática con NaOH 3 M. Finalmente se leyeron las placas en un lector de placas de ELISA a 405 nm.

Procesamiento y análisis de los datos.

El análisis farmacocinético para caracterizar el patrón de disposición sistémica del anticuerpo se realizó mediante la utilización del enfoque alternativo de análisis no compartimental de cálculo de los parámetros. El procesamiento farmacocinético se ejecutó mediante la utilización del programa WinNonlin profesional ver. 2.1, 1997, Pharsight Co., determinándose el perfil farmacocinético concentración vs tiempo para cada animal, así como los parámetros farmacocinéticos correspondientes.

Todos los parámetros farmacocinéticos fueron calculados según lo establecido en la literatura^{20, 21, 22} determinando los parámetros: AUC, CL, V_{ss} , $t_{1/2}$, C_{max} y MRT. Las variables parámetros farmacocinéticos fueron promediadas y se reporta su desviación estándar en cada caso, utilizando el programa estadístico STATISTICA Vers. 6.1, StatSoft Inc.

Análisis estadístico:

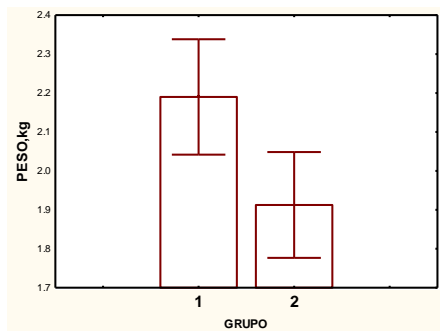
Para determinar las variaciones de los biomarcadores del modelo de enfermedad, se compararon los valores para animales sanos y enfermos al cabo de las 8 semanas planteadas para el tratamiento,

aplicando una prueba de t-Student para grupo independiente, con un nivel de significación de $p < 0.01$ y un intervalo de confianza de 95%. La comparación de los parámetros farmacocinéticos de animales sanos y enfermos, también aplicó la prueba de t-Student para grupos independientes, con un nivel de significación de $p < 0.05$ y un intervalo de confianza de 95%.

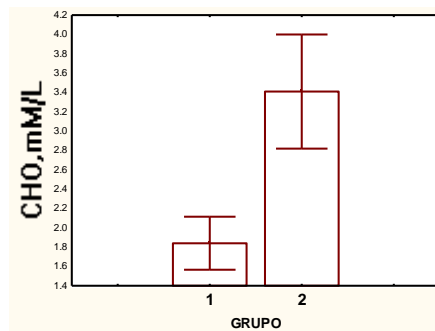
Todas las pruebas estadísticas fueron procesadas mediante el programa estadístico STATISTICA Vers. 6.1, StatSoft Inc.

Resultados

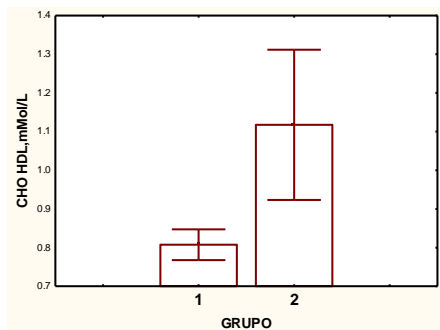
A los fines de evaluar la robustez del modelo de enfermedad ensayado, se reportan en la figura 1 sus valores a las 8 semanas de los animales sanos sin tratamiento y los enfermos tratados con Lipofundin[®], mostrándose las variaciones de los biomarcadores seleccionados donde a excepción del óxido nítrico que disminuye, los demás valores aumentan apreciablemente al final de tratamiento de Lipofundin[®].



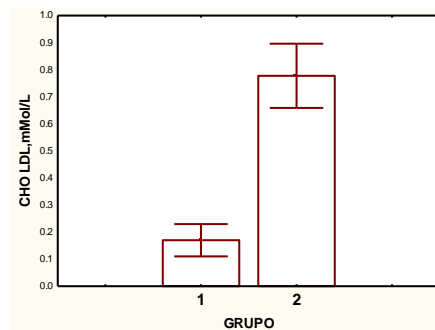
a) Peso



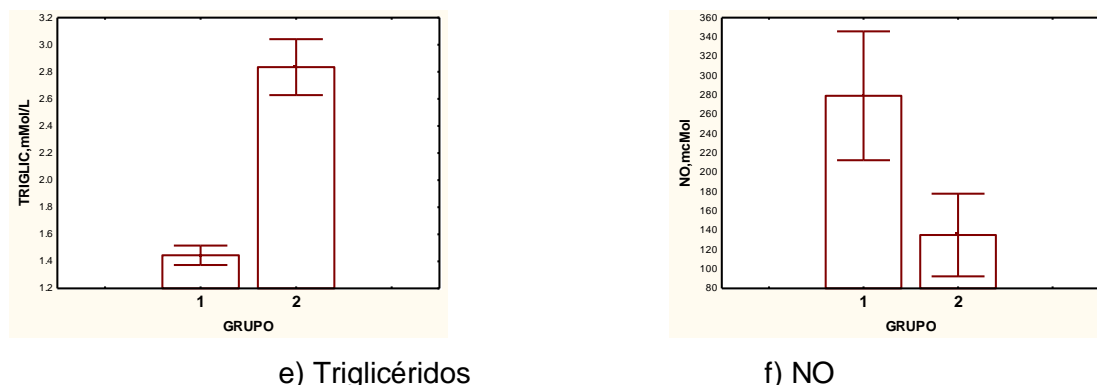
b) Colesterol



c) Colesterol HDL



d) Colesterol LDL



e) Triglicéridos

f) NO

Figura 1. Comparación de los biomarcadores en el modelo de Lipofundin®. Grupo 1: animal sano, Grupo 2: animal enfermo. Valores medios, Intervalo de confianza 95%

La tabla 1, nos presenta los valores comparados estadísticamente, donde se puede distinguir que las variaciones observadas precedentemente manifiestan desviaciones estadísticas significativas en los animales con el modelo de enfermedad al aplicarse el test de Student para un valor de $p < 0.01$.

Tabla 1. Descripción de los biomarcadores en los conejos Nueva Zelandia utilizados en la investigación con modelo de aterosclerosis de Lipofundin®. Prueba de Student, $p < 0.01$

Características	Enfermos *	Sanos
Número de animales	4	4
Peso, Kg	1.91 +/- 0.08 **	2.19 +/- 0.09
Colesterol, mMol/L	3.41 +/- 0.37 **	1.84 +/- 0.17
Triglicéridos, mMol/L	2.83 +/- 0.13 **	1.44 +/- 0.04
Colesterol HDL, mMol/L	1.12 +/- 0.12 **	0.81 +/- 0.03
Colesterol LDL, mMol/L	0.78 +/- 0.07 **	0.17 +/- 0.04
NO, μ Mol/L	135.24 +/- 17.19 **	279.23 +/- 26.83

* Administración *bolus* intravenoso de una dosis diaria de 2 mL/Kg de Lipofundin® durante 8 días.

** Significativamente diferentes de los valores de los sanos para un valor de significación de $p < 0.01$

A fin de distinguir el daño a nivel de aorta en el experimento paralelo con tres conejos que fueron sacrificados para realizar la histología, se muestran en la figura 2 los cortes histológicos de los animales sin y con tratamiento. Es evidente que el tratamiento de Lipofundin® ha producido un engrosamiento de la intima arterial, definiendo una fuerte lesión aterosclerótica.

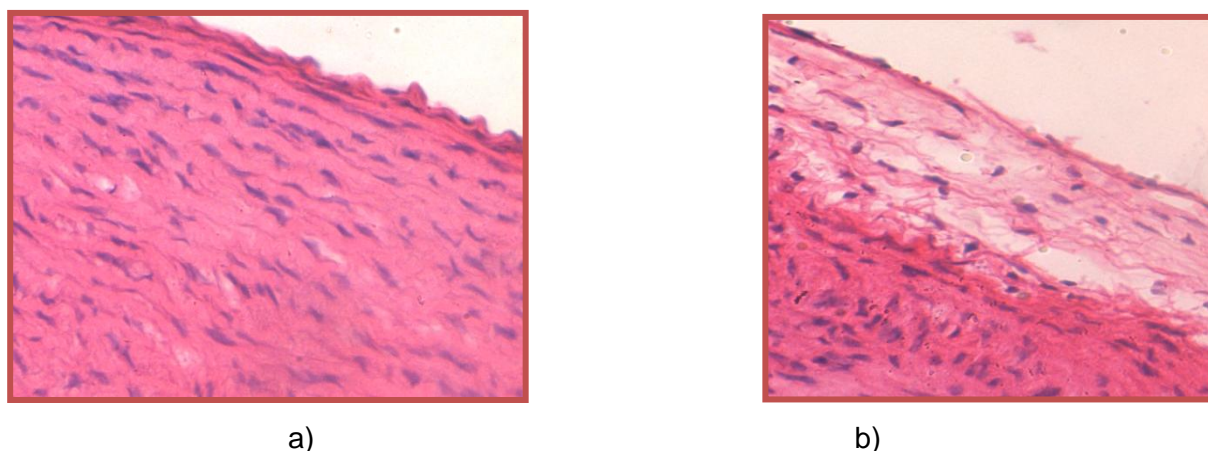


Figura 2. Cortes histológicos de la aorta de conejo, a los 8 días sin y con tratamiento de Lipofundin® dosis diaria de 2 mL/Kg durante 8 días. a) Animal sin tratamiento, 60x b) Animal con tratamiento, 40x. En referencia al experimento farmacocinético en ambas variantes de tratamiento, en la figura 3 se muestran los perfiles farmacocinéticos de concentración de AcM quimérico P3 vs. tiempo, donde prácticamente no se observa cambio sustancial a la función descrita, aunque si se aprecia un ligero aumento del área encerrado bajo la curva, para el animal enfermo.

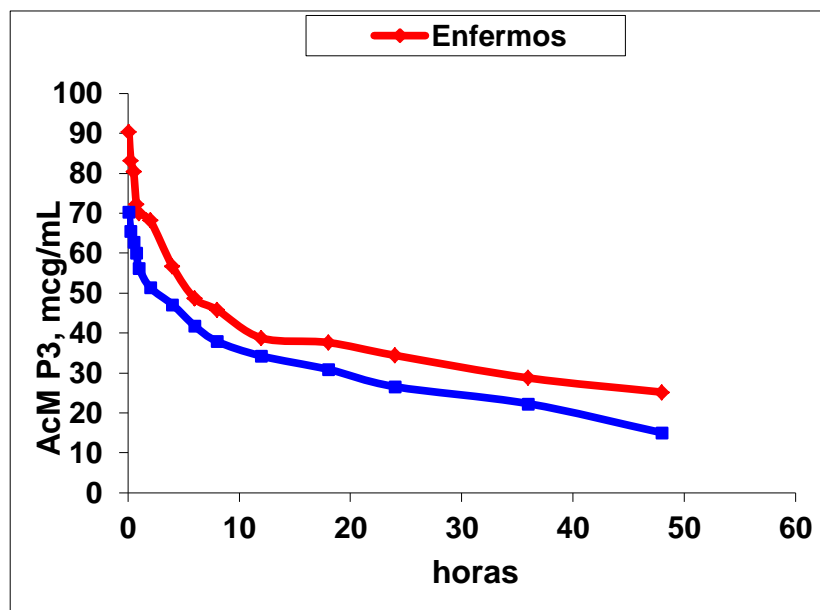


Figura 3. Perfiles farmacocinéticos de datos primarios del AcM quimérico P3 en conejos Nueva Zelanda, sanos y enfermos. Modelo de enfermedad con dosis diaria administrada 2 mg/Kg de Lipofundin®, durante 8 días.

La aplicación de la comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos estimados, mediante un test de Student con un valor de significación de $p < 0.05$, se muestra en la tabla II señalándose que no existen diferencias significativas en ninguno de los parámetros establecidos.

Tabla 2. Efecto sobre la farmacocinética del AcM quimérico P3, en modelo de aterosclerosis producida por tratamiento de Lipofundin[®], administración de un bolo intravenoso de 2 mL/Kg diarios durante 8 días, en conejos Nueva Zelanda. Prueba de Student, $p < 0.05$.

Parámetro	Conejos Sanos, promedio +/- D.E.	Conejos Enfermos, promedio +/- D.E.	Valor de significación, p
$C_{\text{máx}}$, mcg/mL	104.83 +/- 19.06	76.35 +/- 39.88	0.25
$t_{1/2}$, h	43.16 +/- 11.40	33.21 +/- 6.57	0.18
AUC, $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$	3227.35 +/- 659.50	2047.71 +/- 799.36	0.06
CL, mL/h	1.36 +/- 0.23	2.64 +/- 1.50	0.14
MRT, h	60.71 +/- 16.32	47.00 +/- 9.93	0.20
V_{SS} , mL	81.98 +/- 20.92	129.16 +/- 91.34	0.35

Leyenda: Diferencias significativas para $p < 0.05$

Discusión

Los resultados de la figuras 1 y 2, así como de la tabla 1, indican fehacientemente que el modelo de Lipofundin[®] utilizado es capaz de producir manifestaciones de aterosclerosis en los conejos Nueva Zelanda, lo que lo hace eficaz para los objetivos farmacocinéticos del presente trabajo.

Es de señalar que en la fig. 1 y la tabla I, se muestra que con excepción del óxido nítrico, todos los índices medidos incrementan significativamente su valor en correspondencia a las manifestaciones de la enfermedad. La disminución del óxido nítrico, es entendible ya que dicha especie reactiva de oxígeno es el llamado Factor Relajante del Endotelio Vascular, y el engrosamiento de la lesión arterial deviene en causa fundamental que conllevará a un posible fallo cardíaco posterior.

Los cortes histológicos de la figura 2 muestran en los animales enfermos, el engrosamiento de la intima arterial, que presupone un aumento de la concentración de proteoglicanos en la propia lesión, lo cual debe analizarse posteriormente cuando se atiende al comportamiento de los parámetros de la distribución farmacocinética en específico, por constituir posibles centros de captación del AcM quimérico P3.

La figura 3 compara visualmente los perfiles farmacocinéticos de los animales sanos y enfermos, y como tal aparece una ligera diferencia visual en las áreas bajo la curva, AUC, manifiestas entre ambos tratamientos. Ello pudiera deberse a variaciones particulares o simultaneas en los valores de aclaramiento, CL y del volumen de distribución, V_{SS} . Sin embargo el análisis estadístico de la tabla II no pondera diferencias significativas entre todos los parámetros, incluso para la propia AUC. Todo ello apunta que la enfermedad estudiada no interactúa con la farmacocinética del AcM quimérico P3.

Lo anterior expone que la lesión aterosclerótica, no produjo una mayor captación del AcM quimérico P3 en el ateroma formado, y tal como se refleja en la no variación estadística del tiempo de vida media de eliminación, $t_{1/2}$, y del tiempo medio de residencia, MRT, la duración de la posible respuesta farmacológica del mismo no presentará cambios sustanciales.

Debe señalarse que en los estudios precedentes del AcM P3 murino¹², se planteó la afinidad de esta estructura murina por los proteoglicanos, pero no así se ha podido demostrar para la estructura quimérica ensayada en el presente trabajo. Los resultados farmacocinéticos acá mostrados, ratifican esta pobre captación de los proteoglicanos incrementados en la lesión lo que hace que el AcM quimérico P3 no sea eficiente a los intereses terapéuticos de la aterosclerosis. Basándose en el conocimiento básico del AcM P3 y sus idiotipos correspondientes^{22, 23, 24}, para definir la futura aplicación terapéutica, de acuerdo a la interacción con el ligando específico, se aplican los métodos de Ingeniería Genética en el Centro de Inmunología Molecular, par el diseño de novedosas estructuras quiméricas derivadas del AcM P3, como candidatos a investigar como agentes contrarrestantes de los efectos de la aterosclerosis.

Literatura citada

¹ Levy G. Pharmacokinetics in Renal Disease. Ann. J. Med 1977;62:461-465.

² Danhof M and Levy G. Kinetics of drug action in disease states I. Effect of infusion rate on phenobarbital concentrations in serum, brain and CSF of normal rat at onset of loss of righting reflex. J. Pharmacol Exp. Ther 1984;229:44-50.

³ Danhof M, Hisaoka M, and Levy G. Kinetics of drug action in disease states. II. Effect of experimental renal dysfunction on phenobarbital concentrations in rats at onset of loss of righting reflex. J. Pharmacol Exp. Ther 1984;230:627-631.

⁴ Danhof M and Levy G. Kinetics of drug action in disease states.V. Accute effect of urea infusion of phenobarbital concentrations in rats at onset of loss of righting reflex. J. Pharmacol Exp. Ther 1985;232:430-444.

⁵ Danhof M, Hisaoka M, and Levy G. Kinetics of drug action in disease states. XII Effect of experimental liver disease on the pharmacodynamics of phenobarbital and ethanol in rats. J. Pharm. Sci 1985;74:321-324.

⁶ Levy, G. "Can animal models be used to explored PD problems of clinical interest?. En: Topics of Pharmaceutical Sciences. Ed. D.P. Breimer y P. Speiser, Elsevier Sci. Publissner. BV. (Biom. Div.), Amsterdam 1988:93-106.

-
- ⁷ Levy G. Kinetics of drug action-an overview. En: The in vivo study of drug action., Edited by C.J. van Boxtel, N.H.G. Holford and M. Danhof. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1992: xiii- xix.
- ⁸ Levy G. The Case for Preclinical Pharmacodynamics. En: Integration of pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Toxicokinetics in Rational Drug Development, Edited by A. Yacobi et al, Plenum Press, New York 1993:7-13.
- ⁹ Ducongé J, Fernández-Sánchez E, Macías A., Castillo R, García I, Beausoleil I, Amador JF. Monoclonal anti-EGF receptor antibody (ior r3) pharmacokinetic study in nude mice: Role of the receptor mediated endocytosis on drug clearance. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 2002;27:101-105.
- ¹⁰ Ducongé J, Castillo R, Crombet T, Álvarez D, Matheu J, Vecino G, Alonso K, Beausoleil I, Valenzuela C, Becquer MA, Fernández-Sánchez E. Integrated pharmacokinetic/pharmacodynamics modeling and allometric scaling for optimizing the dosage regimen of the monoclonal ior EGF/r3 antibody. European Journal of Pharmaceutical Sciences, Elsevier B.V 2004;21:261-270.
- ¹¹ Ducongé J, Fernández-Sánchez E, Álvarez D. Interspecies Scaling of the Monoclonal Anti-EGF receptor ior EGF/r3 Antibody Disposition Using Allometric Paradigm: Is it really suitable. Biopharmaceutics and Drug Disposition, J. Wiley Intersciences Ltd 2004;25:177-186.
- ¹² Vazquez AM, Alfonso M, Ianne B, Karlsson KA, Carr A, Barroso O, Fernández LE, Reginfo E, Llanio ME, Alvarez C, Zeuthen J, Pérez R. Generation of a Murine Monoclonal Antibody Specific for N-glycolylneuraminic Acid-Containing Gangliosides That Also Recognizes Sulfated Glycolipids. Hybridoma 1995;14(6):551-556.
- ¹³ Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. Trend Immunol 2001;22(12):665-9.
- ¹⁴ Rose N, Afanazyeva M. Autoimmunity: busting the atherosclerotic plaque. Nature Medicine 2003;9, (6):641-642.
- ¹⁵ Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. Laboratory Animals 2004;38 246-256.
- ¹⁶ Yanni AE, Yatzidis H, Kavantzias N, Agapitos E, Perrea D, Karayannacos PE. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbits. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease 2003;13:80-86.
- ¹⁷ Arruzazabala ML, Noa M, Menéndez R, Más R, Carbajal D, Valdés S y Molina V. Protective effect of policosanol on atherosclerotic lesions in rabbits with exogenous hypercholesterolemia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2000;33(7):835-840.

-
- ¹⁸ M. Noa and R. Mas, "Ateromixol y lesión aterosclerótica en Conejos inducida por Lipofundin," *Progresos en Ciencias Médicas* 1992;6:14–19.
- ¹⁹ Delgado L., Acosta E., Fraga A., Becquer M.A., Soto Y., Falcón V., Vazquez A.M., Martinez G., Fernández-Sánchez E. "Lipofundin-Induced Hyperlipidemia Promotes Oxidative Stress and Atherosclerotic Lesions in New Zealand White Rabbits". *International Journal of Vascular Medicine* 2012;7:1-7.
- ²⁰ Gibaldi M, Perrier D. Noncompartmental Analysis based on Statistical Momentm Unforma Healthcare. En: *Pharmacokinetics*, 2nd edition, New York 2007;409-418.
- ²¹ Kwon Y. *Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists*. En: *Pharmacokinetic Study Design and Data Interpretation.*, Kluwe Academic Publishers, New York 2002; 18-27.
- ²² López-Requena A, Mateo de Acosta C, Pérez A, Valle A, Lombardero J, Sosaa K, Pérez R, Vázquez AM. Chimeric Anti-N-Glycolyl-Ganglioside and Its Anti-idiotypic MAb's: Immunodominance of their Variable Regions. *Hybridoma and Hybridomics* 2003; 22(4):235-243.
- ²³ Pérez A, Mier E.S., Santiago-Vispo N, Vázquez AM, Pérez R. A monoclonal antibody against NeuGC-containing gangliosides contains a regulatory idiotope involved in the interaction with B and T cells. *Molecular Immunology* 2002;39:105-112.
- ²⁴ López-Requena A, Bestagno M, Mateo de Acosta C, Cesco-Gaspere M, Vázquez AM, Pérez R, Burrone O.R. Gangliósidos, Ab1 and Ab2 antibodies III. The idiotype of anti-ganglioside mAb P3 is immunogenic in a T cell-dependent manner. *Molecular Immunology* 2007;44:2915-2922.