

Seguridad preclínica de la eritropoyetina humana recombinante HEBERITRO®

✉ Dania M Bacardi¹, Karelía Cosme¹, Ariadne Gutiérrez², Delia N Porras¹, Dioslaida Urquiza¹, Nelson Merino³, José Suárez¹, Ariel Vázquez¹, Ivón Howland⁴, Maité Pérez-Caballero¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: dania.bacardi@cigb.edu.cu

²Centro de Química Farmacéutica, CQF
21 y 200, Atabey, Reparto Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

³Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica, CQF
CP 16 042, Atabey, Reparto Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que aparece en la sangre como respuesta a la hipoxia, y actúa sobre la médula ósea aumentando la producción de eritrocitos. Esta glicoproteína se produce principalmente en el riñón. Su biosíntesis y secreción se estimula por la disminución de la oxigenación del tejido y/o por la disminución de la masa de hematíes. En este trabajo se evalúa la seguridad preclínica de HEBERITRO®, EPO humana recombinante (EPOhr) producida por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad de La Habana, Cuba, mediante estudios preclínicos. Entre ellos, el estudio comparativo de toxicidad aguda (con EPREX®, como similar comercial) y el de tolerancia local. Este producto se administró por vía subcutánea a ratas Sprague-Dawley, en tres niveles de dosis 10, 30 y 60 veces la dosis terapéutica (DT) del producto en el primer estudio y DT, 10 y 20 veces esta, y un placebo de esta. El objetivo de estos esquemas fue la determinación de la posible toxicidad a corto plazo de Heberitro® tras la administración única de varias dosis lo suficientemente altas y del potencial irritante para el tejido subcutáneo luego de siete aplicaciones diarias. Durante estos ensayos, no se reportaron signos de toxicidad, ni alteraciones morfológicas en los animales. Desde el punto de vista histológico no se observaron alteraciones macroscópicas ni morfológicas que evidenciaran toxicidad en los órganos estudiados. De acuerdo con los resultados, este producto no provoca signos de toxicidad ni reacciones locales en el sitio de administración, en el rango de dosis establecido y bajo nuestras condiciones experimentales.

Palabras clave: eritropoyetina, toxicología preclínica, EPREX®, seguridad

Biotecnología Aplicada 2005;22:267-272

ABSTRACT

Preclinical safety demonstration of the recombinant human erythropoietin HEBERITRO®. Erythropoietin (EPOhr) is a glycoprotein that appears in blood as a response to hypoxia and acts over bone marrow increasing erythrocyte production. This glycoprotein is produced mainly by the kidney; its biosynthesis and releasing is stimulated by the reduction of tissue oxygenation decreased and/or the reduction of the mass of erythrocytes. In this report we evaluated the preclinical safety of HEBERITRO®, commercial name of Human Recombinant Erythropoietin (EPOhr) produced by the Center of Genetic Engineering and Biotechnology (CGEB), Havana, Cuba; through preclinical studies such as this the comparative study of acute toxicity, (with EPREX®, as a commercial similar) and local tolerance. This product was administered by subcutaneously into Sprague-Dawley rats, at three doses levels 10, 30 and 60 up to therapeutics' doses (TD) of products on the first study and TD, 10 and 20 times this value, and placebo. The objective of these schedules was to determine the possible toxicity in short time of HEBERITRO® after a single administration of the highest doses and the irritant potential into the subcutaneous tissue after seven applications daily. During these tests the animals did not report signs of toxicity, nor morphologic alterations. According to the obtained results we can conclude that this product no produce toxicity sings or local reactions at administration site in the established ranges of doses and under our experimental conditions.

Key words: erythropoietin, preclinical toxicology, EPREX®, safety

Introducción

La eritropoyetina (EPO) es un factor de crecimiento y viabilidad esencial para los progenitores eritrocitarios de la médula ósea, pues regula la producción de eritrocitos y la adapta a las necesidades fisiológicas de oxígeno. Fue aislada originalmente de la orina de pacientes con anemia aplásica [1] y se caracterizó como una proteína de 34 000 daltons de peso molecular. Los carbohidratos forman el 40% de la estructura de la molécula. Las cuatro cadenas de carbohidratos están unidas a la molécula por tres enlaces N-glicosídicos y

uno O-glicosídico, y el ácido siálico es el principal compuesto hidrocarbonato. Estos residuos son fundamentales para la actividad biológica de la EPO [2]. Los ácidos siálicos terminales protegen la molécula de su degradación rápida en el hígado, y así conservan su actividad en la médula ósea. La disociación enzimática del ácido siálico por la enzima neuraminidasa origina la pérdida de su actividad *in vivo*.

Desde el estudio clásico de Jacobson en ratas anéfricas [3], se ha asumido que el riñón es el sitio

1. Miyake T, Kung C, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1997;252:5558-64.

2. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA derived erythropoietin. *J Biol Chem* 1987;262(35):17156-63.

3. Jacobson LD, Goldwasser E, Fied W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957;179:633-4.

fisiológico de síntesis de EPO y que la magnitud de su producción se incrementa como respuesta a la anemia generalizada o a la reducción selectiva del suministro de oxígeno al riñón. Esta molécula interactúa con sus células diana mediante receptores específicos en la superficie celular. Estos receptores se expresan primariamente por células progenitoras eritroides, pero también por células madre embrionarias, células progenitoras hematopoyéticas multipotentes, células endoteliales y células neurales [4-6].

La obtención de EPO humana por la tecnología del ADN recombinante (EPOhr) ha permitido su amplio uso terapéutico. La experiencia clínica ha demostrado que esta molécula a dosis entre 50 y 100 U/kg, por las vías endovenosa o subcutánea, corrige la anemia asociada con diferentes entidades como: insuficiencia renal crónica, terapia con zidovudina en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), artritis reumatoide, quimioterapia, prematuridad, transfusiones antológicas y enfermedades oncohematológicas, entre otras [7-12].

En los estudios clínicos con la EPO no se han asociado reacciones alérgicas sistémicas por estas vías [10]; aunque se han observado reacciones cutáneas locales y artralgia en unos pocos pacientes [13]. Estos eventos se han relacionado más con el uso de la albúmina humana en la formulación de la EPO que con sus efectos biológicos [13, 14]. Los pacientes con enfermedad renal pueden presentar un agravamiento de la hipertensión arterial, convulsiones y episodios trombotólicos [15]; no obstante, estos efectos adversos no han constituido problemas significativos cuando la EPOhr se ha utilizado en otras situaciones clínicas.

Aunque la eritropoyetina endógena y la eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) son similares en cuanto a sus propiedades biológicas y químicas, excepto algunas microheterogeneidades en sus cuatro cadenas de carbohidratos [2], no son bien toleradas, por lo que es imprescindible la valoración de la seguridad preclínica de estas. Los estudios de toxicidad en modelos animales pueden tener un valor predictivo para humanos, por lo que resultan imprescindibles al evaluar un nuevo producto [16]. Durante la evaluación preclínica de HEBERITRO® se realizaron diseños para lograr la valoración de su seguridad mediante estudios, entre los que se encuentran la evaluación de la toxicidad a dosis única y la tolerancia local. Para ello se siguieron esquemas que permitieron clasificar el producto mediante dosis única en un estudio comparativo con un similar comercial (EPREX®) y evaluar su potencial irritante en el sitio de inyección con aplicaciones en forma reiterada.

Materiales y métodos

Los estudios se llevaron a cabo según las normas éticas descritas para el uso de animales de experimentación [17], siguiendo las guías de las Buenas Prácticas de Laboratorio [18-19] y los Procedimientos Patrones de Operación aprobados para la realización de estudios toxicológicos [20].

Animales de ensayo

Se utilizó la sublínea de ratas Cenp: SPRD ALY® (Sprague-Dawley) suministrada por la división de

roedores gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). A su llegada a la instalación, los animales fueron clínicamente examinados, pesados y alojados de forma individual en cajas de makrolón con lecho de bagazo de caña, estéril. Se mantuvieron en observación durante 7 días antes del inicio de los estudios en condiciones ambientales controladas (temperatura entre 19 y 21 °C, humedad relativa promedio de 68% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas), las cuales permanecieron constantes durante la fase experimental. El alimento (ALY co., CENPALAB, Cuba) se suministró diariamente a razón de 25 g por animal y el agua se suministró *ad libitum*.

Formulación

Se emplearon formulaciones de HEBERITRO® producidas en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Ciudad de La Habana, Cuba) y EPREX® comercializada por Johnson and Johnson (Gran Bretaña), para el tratamiento de la anemia. La EPOhr es una citocina obtenida por vía recombinante. En ambos estudios se emplearon 4 lotes de HEBERITRO®, obtenidos con 99% de pureza (HPLC-RP), actividad biológica de 70.4×10^6 U/mL y concentración de proteínas (Lowry) de 0.39 mg/mL. Además, se confirmaron la esterilidad, la apirogenicidad, el pH, el volumen y la estabilidad de este producto. El EPREX®, producido por Johnson and Johnson, se obtuvo de un lote comercial (B10060) y el placebo compuesto por los mismos componentes de la formulación de HEBERITRO® menos el principio activo de esta.

Diseño experimental

Los estudios se diseñaron siguiendo las regulaciones descritas por ICH/EMEA (International Conference on Harmonization/European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) [21-24]. En el diseño se incluyeron, además, aspectos descritos en la guía designada como 425 de la OECD [25]. Los animales empleados en los estudios de toxicidad aguda y de tolerancia local se escogieron de forma aleatoria siguiendo una lista generada por el Programa Marsman FR [26] e inoculados por vía subcutánea.

Grupos experimentales y dosificación

Para el estudio de toxicidad aguda se emplearon 70 ratas, de ambos sexos, los machos con un peso promedio de 234.5 g y las hembras con 182.6 g, y entre 5 y 6 semanas de edad; mientras que para la evaluación del sitio de inoculación o tolerancia local se escogieron aleatoriamente 40 ratas, machos. En ambos experimentos, la variación del peso corporal no excedió el 20% del valor promedio de 199.3 g (edad entre 6 y 7 semanas). Los animales se distribuyeron según el esquema de la tabla 1.

Frecuencia de la inoculación

En el estudio de toxicidad aguda se realizó una inoculación única el día 1 del estudio, mientras que en el de tolerancia local, todos los animales recibieron siete inyecciones consecutivas diarias. En ambos casos se empleó la vía subcutánea (vía que se empleará en el estudio clínico), en el espacio interescapular.

4. Mulcahy L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* 2001;28(2 Suppl 8):19-23.

5. D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor: colon subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990;86:681-7.

6. Wickrema A, Krantz SB, Winkelmann JC, Bondurant MC. Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells. *Blood* 80 (1992):1940-9.

7. Kindler J, Eckardt KU, Ehmer B, Jandeleit K, Kurtz A. Single dose pharmacokinetics of recombinant erythropoietin in patients with various degrees of renal failure. *Nephrol Dial Transp* 1989;4:345-9.

8. Fischl M, Galpin JE, Levine JD, Groopman JE, Henry DH, Kennedy P, Miles S, Robbins W, Starrett B, Zalusky R. Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *N Engl J Med* 1990;322(21):1488-93.

9. Frej F, Katarine R, Matti A, Tytti K. Erythropoietin: origin, bone marrow receptors and relation to rennin substrate. *Aifu Nephrol* 1987;16:379-90.

10. Erythropoietin. Molecular physiology and clinical applications. NY, USA Ed. C Bauer;1994.

11. Hans N, Jurgen B, Emmanuel F, Ivar R, Paul S. Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after Scadministration. *Contrib Nephrol* 1989;76:124-30.

12. Ian CM, David ER, Meter N, Douglas AD, Gerald AC, John DW. Pharmacokinetics of intravenous, intraperitoneal and subcutaneous recombinant erythropoietin in patients on CAPD. *Contrib Nephrol* 1989;79:112-21.

13. Weber G, Gross J, Kromminga A, Loew HH, Eckardt KU. Allergic skin and systemic reactions in a patient with pure red cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies challenged with different epoetins. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(9):2381-3.

14. Hamilton J A. No disposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action. *J Leukoc Biol* 2003;73(6):702-12.

15. Topaloglu R. Progression to renal failure. *Turk J Pediatr* 2005;47:3-8.

16. DiPasquale L, Hayes W. Acute Toxicity and Eye Irritancy. In: Principles and methods of Toxicology. Hayes W (ed.), Fourth Edition. Taylor and Francis, Philadelphia, USA;2001.p.864-7.

17. NRC. National Research Council. Animal Alternatives, Welfare and Ethics, Edited by LFM van Zutphen and M Balls. Developments in Animal and Veterinary Sciences 1997;27.

18. Cosme K. Programa para el Uso de Animales de Experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Edición 01;1998.

19. Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council. On the harmonization of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principle of good laboratory practice and the verification of their applications for test on chemical substances. Official Journal of the European Union. pp L 50/44-L 50/59. 11/ Feb/2004.

Duración del ensayo y observaciones

El estudio de toxicidad aguda tuvo una duración de 14 días, tras los cuales se sacrificaron los animales. Durante la fase experimental, estos animales se mantuvieron en las condiciones ambientales descritas y se realizaron observaciones clínicas diarias, a fin de registrar cualquier variación en el comportamiento o signo de toxicidad. Estas evaluaciones clínicas se realizaron según el método de valoración descrito por DiPascuale y Hayes [15] e incluyeron cambios en la piel, el pelaje, la coloración y la apariencia de las membranas mucosas y de los ojos, el sistema respiratorio, el nervioso central y autónomo y en la actividad somatomotora. La medición del peso corporal se realizó los días 1, 7 y 14 del estudio y el consumo de alimento se cuantificó con una frecuencia diaria. Las determinaciones hematológicas se realizaron a todos los animales por grupo de tratamiento, el día 1 del ensayo (sin inocular) y antes del sacrificio. Como parámetros de interés se evaluaron: recuento de hematíes y leucocitos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH), recuento de reticulocitos, plaquetas, hemoglobina y hematocrito, con el empleo de un analizador hematológico digital *Celltac α*.

En la evaluación de la tolerancia local se mantuvieron en estudio durante 8 días todos los grupos. Los parámetros de observación empleados fueron similares a los descritos para el estudio de toxicidad aguda, además de la evaluación de signos locales como irritación, edema, eritema, inflamación e induración. A las 24 horas de la primera administración, se realizó el sacrificio de 5 animales de cada grupo. Los restantes se sacrificaron a los 8 días del estudio.

Estudio histopatológico

El día señalado para cada sacrificio, a los animales se les practicó eutanasia mediante dislocación cervical luego de un tratamiento anestésico con éter y fueron desangrados por un corte en la arteria femoral. Se procedió a la observación de la superficie corporal y de las cavidades, así como a la necropsia, en la que se realizó el examen macroscópico de todos los órganos. Se tomaron muestras de bazo, hígado, médula ósea, ganglios mesentéricos y sitio de administración, las cuales se procesaron con el empleo de una tinción de eosina-hematoxilina y se observaron en un microscopio simple Carl Zeiss, Alemania, con aumentos de 40X y 100X [27].

Procesamiento de datos

Las variables usadas para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal (PC), el consumo promedio semanal de alimentos (CA), las variables hematológicas y los hallazgos microscópicos (HM). En todos los casos se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, valores máximos y mínimos). Para el caso específico de la hematología se creó la variable DF (diferencias entre las mediciones finales e iniciales de las variables hematológicas).

Para los análisis de PC y CA se verificaron los supuestos de normalidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) [28] y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) en cada tiempo de

Tabla 1. Distribución por grupos de los animales para los estudios de toxicidad de HEBERITRO®.

| Toxicidad aguda | | | | |
|------------------|------------|-------------------------------|------------------------|--------------|
| Grupo | # animales | Tratamiento | Producto/Dosis (UI/kg) | Volumen (μL) |
| I | 10 | - | Placebo/0 | 940 |
| II | 10 | 10 veces la dosis terapéutica | HEBERITRO®/1500 | 160 |
| III | 10 | 30 veces la dosis terapéutica | HEBERITRO®/4500 | 470 |
| IV | 20 | 60 veces la dosis terapéutica | HEBERITRO®/9000 | 940 |
| V | 20 | 60 veces la dosis terapéutica | EPREX/9000 | 940 |
| Tolerancia local | | | | |
| I | 10 | - | Placebo/0 | 300 |
| II | 10 | dosis terapéutica | HEBERITRO®/150 | 20 |
| III | 10 | 10 veces la dosis terapéutica | HEBERITRO®/1500 | 150 |
| IV | 10 | 20 veces la dosis terapéutica | HEBERITRO®/3000 | 300 |

evaluación y para cada sexo, para lo cual se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) paramétrico o la alternativa no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis) [28], en dependencia del cumplimiento de los supuestos de distribución. Se realizaron comparaciones pareadas en los intervalos consecutivos, con el empleo de la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon [28], en función del cumplimiento del supuesto de aproximación por una distribución normal. Los resultados del estudio histopatológico se analizaron mediante la construcción de las tablas de clasificación cruzadas, con la prueba de independencia asociada (prueba exacta de Fisher) [28]. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 8.0 sobre Windows [29].

Resultados y discusión

Observaciones clínicas

En el estudio de toxicidad aguda, tras las observaciones clínicas diarias, no se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos en los animales inoculados con HEBERITRO® y EPREX®. No se reportaron cambios en el pelaje. La coloración, la apariencia de los ojos y las membranas mucosas estaban normales, así como la actividad somatomotora y de comportamiento. Ante los estímulos se observó una adecuada respuesta. En el estudio no se registraron muertes. Al evaluar el sitio de inoculación, no se evidenciaron señales de daño atribuibles a las inoculaciones de la EPOhr. Solo en el estudio de tolerancia local (áreas hemorrágicas) se observaron signos clínicos relacionados con el método y la reiteración de la inoculación y no con la EPOhr, ya que este efecto se observó con igual intensidad en el grupo inoculado con el placebo de la formulación. Las determinaciones hematológicas resultaron normales al ser comparadas con sus correspondientes magnitudes a tiempo cero.

Peso corporal y consumo de alimento

En el ensayo de toxicidad aguda se mantuvo un incremento significativo del peso corporal en el tiempo, como se aprecia en la figura 1.

De manera independiente, en el estudio de toxicidad aguda se observó un aumento sostenido del peso

20. PPO 1.27.260.96. Ensayo de Toxicidad Aguda y Parenteral. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Edición 04;2003.

21. Safety Studies for Gene Therapy Products. Committee for Proprietary Medicinal Products. EMEA. CPMP/SWP/112/98,1998. <http://www.EMEA.EU.int.com>.

22. EMEA/ ICH. CPMP/SWP/2145/00 (2000). Note for Guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products. <http://www.EMEA.EU.int.com>.

23. EMEA/ ICH. CPMP/EWP/463/97 (1999) Note for guidance on clinical evaluation of new vaccines. <http://www.EMEA.EU.int.com>.

24. EMEA/ ICH. CPMP/ICH/286/95 (2000) No clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (M) <http://www.EMEA.EU.int.com>.

25. Organisation for economic co-operation and development (OECD). Section 4, Health Effects. OECD 425. Up-Dawn Procedure. Update Guideline, December 2001. <http://www.EMEA.EU.int.com>.

26. Programa Marsman FR (RIVM, Bilthoven, The Netherlands);2002.

27. MacMagnus JF, Mowry RW. Staining methods, histologic and histochemical. Madrid, Atika SA eds.;1968.p.123-5.

28. Hochberg Y. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 1988;75:800-2.

29. SPSS Inc. Statistical Package Scientific System, version 8.0, Windows;1997.

corporal para ambos sexos, al comparar los resultados en cada tiempo de evaluación: 0, 7 y 14 días ($p=0.01$) (Tablas 2 y 3), sin que existieran diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ($p>0.05$), incluyendo el grupo que corresponde al similar comercial, EPREX®. El consumo de alimentos tuvo un comportamiento oscilante entre los grupos en cada tiempo valorado. Se detectaron diferencias significativas entre los grupos en el día 1: en el sexo masculino, I-III, $p=0.008$; I-IV, $p=0.001$ y en el sexo femenino, II-VI, $p=0.001$; III-V, $p=0.008$ en este mismo tiempo. A pesar de estas diferencias, se destaca un incremento significativo de este parámetro en todos los grupos en la medida en que transcurre el estudio, el cual se traduce en un aumento normal del peso de los animales de ambos sexos. Esto constituye un índice de bienestar de los animales y, por tanto, resulta un elemento importante para sustentar la no toxicidad de la citoquina objeto de estudio en este experimento.

En la determinación de la tolerancia local se evidenció una ganancia de peso corporal en el período evaluado, sin que se reportaran diferencias significativas entre los grupos para cada tiempo de pesaje (0 y 8 días).

En estos esquemas de toxicidad aguda (inoculación única, con 10, 30 y 60 veces la DT) y de tolerancia local (administraciones diarias durante siete días, DT, 10 y 20 veces) en todos los animales se apreció un incremento progresivo del peso durante el período de experimentación, lo cual es un índice favorable para la sustancia en estudio, teniendo en cuenta que no existe una influencia negativa de esta sobre la ganancia de peso corporal. Uno de los signos clínicos primarios ante el estrés o enfermedad, en esta especie de ratas es la disminución del peso corporal, por lo que el efecto contrario se considera un signo de bienestar animal [15, 30], lo que indirectamente evidencia la ausencia de toxicidad de la sustancia analizada en este estudio. En los animales inoculados con HEBERITRO® y EPREX®, incluso en aquellos que recibieron dosis elevadas, el incremento del peso corporal coincide con lo reportado en la curva de crecimiento para animales sanos de IFFA-CREDO [31].

Hallazgos macroscópicos

Desde el punto de vista macroscópico, todos los órganos presentaron morfología normal sin evidencias de cambios anatómicos que indicaran alguna alteración, según los reportes durante la necropsia en ambos estudios. Al evaluar el sitio de administración, se observaron áreas hemorrágicas en cuatro animales del grupo I (placebo) y tres del grupo IV (20 veces la DT) con dos aplicaciones. Este signo está presumiblemente relacionado con el traumatismo causado por la inoculación subcutánea repetida en un mismo sitio. Las observaciones macroscópicas corroboran las observaciones clínicas, al no reportarse afectaciones atribuibles a la eritropoyetina, sin evidencia de irritación local o daño. La ausencia de hallazgos macroscópicos en los órganos y tejidos de los animales de estos grupos, es un elemento importante en el momento de analizar la seguridad del producto que se ensayó en ambos estudios. Es importante recalcar la ausencia de reportes, independientemente de las dosis y volúmenes administrados.

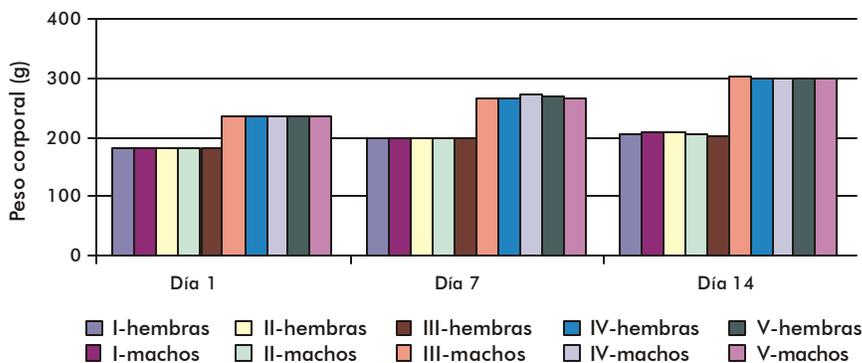


Figura 1. Comportamiento del peso corporal en gramos (g). Estudio de toxicidad aguda.

Parámetros hematológicos

De las variables hematológicas determinadas, se detectaron diferencias en la variable DF entre los grupos, en los parámetros siguientes:

- HCM sexo masculino (I-III $p=0.042$)
(II-III $p=0.02$)
(II-IV $p=0.008$)
(III-IV $p=0.005$)
(IV-V $p=0.002$)
- CCMH sexo masculino (I-II $p=0.028$),
(I-V $p=0.032$),
(II-IV $p=0.048$),
(IV-V $p=0.041$)
- sexo femenino (I-II $p=0.026$)
(I-V $p=0.005$)
(IV-V $p=0.015$)

Las diferencias se encontraron en los grupos inoculados con HEBERITRO® y EPREX®, también en el control (inocular con placebo de la formulación). Estos

30. Victor Lucas Jr. Animal Use in Toxicity Evaluation pp. 9-33, Anesthetic Toxicity. Edited by Susan A Rice and Kevin J Fish. Raven Press Ltd. New York;1994.

31. IFA CREDO. Productos y servicios; 2001.

Tabla 2. Estudio de toxicidad aguda: variaciones en el promedio de peso corporal (g) (media ± desviación estándar).

| Grupo | Día 1 | | Día 7 | | Día 14 | |
|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | Hembras | Machos | Hembras | Machos | Hembras | Machos |
| I | 182.2±8.44 | 234.6±9.76 | 194.80±13.70 | 264.6±6.43 | 204.2±15.93 | 303.2±7.40 |
| II | 182.8±15.35 | 234.8±10.99 | 194.80±17.67 | 265.6±11.72 | 208.4±17.39 | 296.8±13.29 |
| III | 182.4±12.3 | 234.8±7.43 | 195.60±15.82 | 270.80±8.35 | 209.6±17.81 | 298.0±8.66 |
| IV | 182.4±8.80 | 234.5±10.93 | 196.80±11.60 | 268.5±7.03 | 202.8±19.77 | 300.6±9.81 |
| V | 182.2±5.51 | 234.1±7.40 | 197.30±12.54 | 265.90±5.95 | 201.8±13.31 | 295.8±9.01 |

$p < 0.05$

Tabla 3. Estudio de tolerancia local: variaciones en el promedio de peso corporal (g) (media ± desviación estándar).

| Grupo | Día 1 | Día 8 |
|-------|----------------|-----------------|
| I | 201.00 ± 21.31 | 236.00 ± 20.43* |
| II | 196.20 ± 20.43 | 241.20 ± 21.39* |
| III | 200.40 ± 8.62 | 240.60 ± 9.24* |
| IV | 199.40 ± 15.09 | 241.80 ± 7.05* |

* $p < 0.01$

valores se mantuvieron dentro de los rangos normales para la especie empleada [32-34].

Los conteos de hemoglobina y hematocrito elevados (Tabla 4), así como los decrementos reportados en los leucocitos, confirmaron el efecto terapéutico de la EPO. Estos resultados deben estar relacionados con la movilización de células progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica dado el mecanismo de acción del producto ensayado [35].

Estudio histopatológico

Toxicidad aguda

En el bazo, el hígado, los ganglios mesentéricos y la médula ósea no se observaron signos morfológicos de toxicidad (Tabla 5). En la histología hepática, en todos los grupos, incluyendo el placebo, se observaron reacciones celulares focales con una incidencia de 3-5 animales por grupo. Estas reacciones se caracterizan por agrupaciones de células mononucleares de no más de 5 ó 6 células en la periferia de las vénulas centrolobulillares (Figura 2), sin signos de degeneración o necrosis celular, hallazgo que afectó por igual a todos los grupos de tratamiento, incluido el grupo V al que

se le administró EPREX®. La literatura describe estas reacciones como consecuencia de la intensa actividad metabólica de este órgano y han sido reportados con frecuencia como espontáneas en esta especie animal [36, 37]. Su presencia en los grupos control indica que su aparición no responde al efecto de las diferentes dosis ensayadas de eritropoyetina humana recombinante en una u otra formulación. Es importante señalar que aun en estos puntos el comportamiento y los resultados histopatológicos son similares entre HEBERITRO® y EPREX®.

Tolerancia local

Los hallazgos histopatológicos en el sitio de inoculación se analizaron en dos etapas: a las 24 horas y a los 8 días. Estos resultados se muestran en la tabla 6.

A las 24 horas, tanto el grupo I (placebo) como el II (DT) presentaron igual comportamiento y el 80% de los animales tratados no presentaron alteraciones en el tejido celular subcutáneo. En cambio, en los grupos III (dosis intermedia) y IV (dosis alta), el 60 y el 80% de los animales, respectivamente, presentó una reacción focal discreta, que se caracterizó por ser focalizada,

Tabla 4. Estudio de toxicidad aguda: parámetros hematológicos (valor promedio \pm desviación estándar).

| Grupo | Leucocitos (%) | | Eritrocitos ($\times 10^{12}/L$) | | Hemoglobina (g/dL) | | Hematocrito (%) | | VCM (μm^3) | | HCM (pg) | | CCMH (%) | |
|---------|----------------|----------------|------------------------------------|----------------|--------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final | Inicio | Final |
| Machos | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 6.5 \pm 1.8 | 3.78 \pm 1.1 | 5.21 \pm 0.2 | 5.52 \pm 0.3 | 11.9 \pm 0.5 | 13.2 \pm 0.9 | 33.9 \pm 1.5 | 39.5 \pm 3.4 | 64.8 \pm 2.2 | 71.6 \pm 3.2 | 22.9 \pm 0.6 | 24.0 \pm 0.4 | 35.1 \pm 0.4 | 33.6 \pm 1.1 |
| II | 5.84 \pm 1.1 | 2.6 \pm 0.5 | 5.34 \pm 0.3 | 6.1 \pm 0.4 | 11.9 \pm 0.3 | 13.1 \pm 0.5 | 33.9 \pm 1.5 | 41.3 \pm 2.8 | 64.0 \pm 1.7 | 67.6 \pm 2.1 | 22.4 \pm 0.9 | 21.5 \pm 0.9 | 35.2 \pm 0.7 | 31.8 \pm 1.3 |
| III | 7.48 \pm 2.5 | 3.6 \pm 0.9 | 5.21 \pm 0.3 | 5.66 \pm 0.2 | 11.8 \pm 0.3 | 13.0 \pm 0.4 | 33.9 \pm 1.2 | 39.3 \pm 2.4 | 65.4 \pm 2.6 | 69.4 \pm 4.1 | 22.7 \pm 1.0 | 22.9 \pm 0.8 | 34.8 \pm 0.6 | 33.2 \pm 1.3 |
| IV | 7.27 \pm 1.2 | 4.63 \pm 2.2 | 5.22 \pm 0.2 | 5.74 \pm 0.2 | 11.9 \pm 0.4 | 12.8 \pm 0.5 | 32.6 \pm 4.5 | 37.7 \pm 2.4 | 64.9 \pm 2.1 | 67.6 \pm 8.1 | 22.8 \pm 0.6 | 22.3 \pm 0.7 | 35.2 \pm 0.5 | 34.0 \pm 1.8 |
| V | 8.15 \pm 2.2 | 4.41 \pm 1.7 | 5.04 \pm 0.6 | 5.91 \pm 0.5 | 11.9 \pm 0.7 | 13.0 \pm 0.7 | 31.7 \pm 2.8 | 37.8 \pm 2.8 | 62.8 \pm 2.3 | 64.2 \pm 3.9 | 23.9 \pm 1.3 | 22.1 \pm 1.1 | 37.9 \pm 1.5 | 34.5 \pm 1.4 |
| Hembras | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 6.64 \pm 2.3 | 2.04 \pm 1.1 | 5.56 \pm 0.52 | 5.69 \pm 0.2 | 12.2 \pm 0.8 | 12.8 \pm 0.2 | 34.5 \pm 2.7 | 36.7 \pm 0.9 | 62.0 \pm 1.6 | 64.6 \pm 2.1 | 21.9 \pm 0.8 | 22.6 \pm 0.7 | 35.3 \pm 0.7 | 34.9 \pm 0.6 |
| II | 5.74 \pm 1.8 | 2.96 \pm 0.9 | 5.09 \pm 0.4 | 4.89 \pm 1.5 | 11.7 \pm 0.7 | 12.3 \pm 1.8 | 32.2 \pm 1.6 | 34.4 \pm 5.5 | 63.6 \pm 2.6 | 66.4 \pm 3.4 | 23.2 \pm 1.4 | 27.2 \pm 8.0 | 36.5 \pm 0.9 | 40.6 \pm 10.7 |
| III | 4.87 \pm 0.8 | 3.48 \pm 1.2 | 5.50 \pm 0.5 | 5.41 \pm 0.5 | 12.4 \pm 0.5 | 12.7 \pm 1.4 | 34.8 \pm 2.2 | 36.1 \pm 4.1 | 63.3 \pm 2.6 | 68.2 \pm 2.6 | 22.7 \pm 0.9 | 24.2 \pm 0.9 | 22.7 \pm 0.9 | 24.4 \pm 0.9 |
| IV | 6.44 \pm 1.4 | 3.84 \pm 1.3 | 5.50 \pm 0.3 | 5.63 \pm 0.2 | 12.3 \pm 0.6 | 13.2 \pm 0.4 | 34.4 \pm 1.6 | 36.2 \pm 1.2 | 62.4 \pm 1.8 | 64.4 \pm 2.3 | 22.3 \pm 0.8 | 22.4 \pm 0.7 | 22.3 \pm 0.8 | 22.4 \pm 0.7 |
| V | 6.40 \pm 1.8 | 3.89 \pm 0.8 | 5.22 \pm 0.3 | 5.85 \pm 0.3 | 12.6 \pm 0.5 | 13.7 \pm 0.5 | 32.0 \pm 1.3 | 37.6 \pm 1.5 | 61.3 \pm 1.3 | 64.3 \pm 2.5 | 24.1 \pm 0.9 | 23.4 \pm 0.4 | 24.1 \pm 0.9 | 23.4 \pm 0.4 |

Tabla 5. Estudio de toxicidad aguda: frecuencia de aparición de las observaciones microscópicas en el sitio de inoculación con una única administración y los animales sacrificados a las 24 horas.

| Grupo | Sin alteración en el tejido subcutáneo | Reacción discreta |
|-------|--|-------------------|
| I* | 4/5 | - |
| II | 4/5 | 1/5 |
| III* | 1/5 | 3/5 |
| IV | 1/5 | 4/5 |

Leyenda:

Reacción discreta: reacción focal, poco celular, sin otras alteraciones.

*Grupos que presentaron un animal no evaluable.

poco celular y sin otras alteraciones, como se muestra en la figura 3.

En los animales que se inocularon durante siete días, los signos reportados fueron principalmente reacciones inflamatorias de diferentes intensidades (discretas, moderadas y severas), según la extensión de la reacción y el número de células presentes acompañadas o no de hemorragia. En este momento del ensayo, la mayoría de los animales del esquema no presentan alteraciones en el tejido subcutáneo. El grupo al que se inoculó la dosis terapéutica mostró los mejores resultados, pues 7 de 10 animales no tenían alteración aparente. En orden decreciente, le siguieron los grupos I (placebo) y III (20 veces la DT), con 4 y 5 animales de 10, respectivamente, mientras que el

32. International Committee for Standardization in Haematology: Recommendations for haemoglobinometry in human blood. *Br J Haematol* 1967;13:71.

33. Wintrobe M, Lee G. *Clinical Hematology*. 7ma ed. Philadelphia, Lea and Febiger (eds.);1974.

34. Cotter D, Sage BH. Performance of the LARC classifier in clinical laboratories. *J. Histochem. Cytochem* 1976;24:202.

35. Cromelin A, Sindelar D. *Pharmaceutical Biotechnology*. Flynn J. and Rosman A. Chapter 8. Hematopoietic Growth Factors. Harwood Academic Publishers;1998.

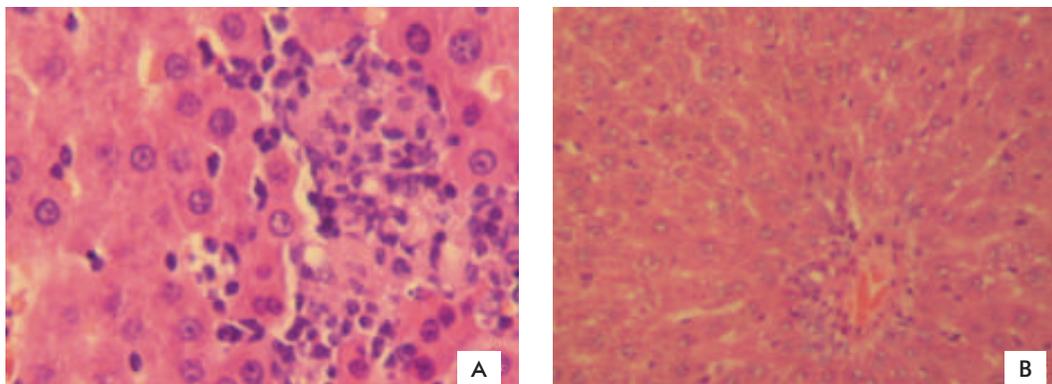


Figura 2. Estudio de toxicidad aguda. A. Agrupaciones de células mononucleares, hallazgo histopatológico observado en el hígado, en un animal del grupo V (60 veces la dosis terapéutica). B. Aspecto normal del hígado.

número más bajo le correspondió al grupo IV (30 veces la DT). En la clasificación de reacción inflamatoria discreta, el mayor porcentaje lo presentó el grupo inoculado con placebo de la formulación con 4 animales de 10, mientras que los restantes grupos tuvieron una frecuencia de aparición similar, de manera que se pudo verificar que la aparición de este hallazgo no depende de la EPOhr. Con una reacción moderada (Figura 4) se registraron 2; 1; 1 y 3 animales de 10 en los grupos I, II, III y IV, respectivamente; mientras que solo se reportó 1 animal de 10 en el grupo III con reacción inflamatoria severa. En la mayoría de los sitios inoculados en los grupos II y III no se observaron alteraciones en el tejido celular subcutáneo, mientras que en los grupos I y IV se evidenciaron más sitios afectados que se comportaron de manera similar. Estos sitios coincidieron con los de mayor volumen de inoculación, lo que podría deberse presumiblemente a la presencia de la albúmina humana en la formulación.

Estos resultados sugieren que hubo una adecuada tolerabilidad por vía subcutánea aun con estos incrementos de dosis y volumen.

Es importante destacar que no se observaron signos morfológicos de irritación o necrosis del tejido muscular en ninguno de los grupos estudiados. Dada la ausencia de efectos tóxicos en ambos estudios y la similitud en el patrón de respuesta al reportado para EPREX®, como similar comercial registrado y reco-

Tabla 6. Estudio de tolerancia local: frecuencia de aparición de los hallazgos microscópicos en el sitio de inoculación con siete administraciones y sacrificados a los 8 días.

| Grupo | Sin alteración en el tejido subcutáneo | Reacción discreta | Reacción moderada | Reacción severa |
|-------|--|-------------------|-------------------|-----------------|
| I | 4/10 | 4/10 | 2/10 | - |
| II | 7/10 | 2/10 | 1/10 | - |
| III* | 5/10 | 2/10 | 1/10 | 1/10 |
| IV* | 3/10 | 3/10 | 3/10 | - |

Leyenda:

Reacción discreta: reacción focal, poco celular, sin otras alteraciones.

Reacción moderada: reacción focal o difusa extensa, pero con más concentración de células.

Reacción severa: reacción usualmente difusa, con hemorragia extensa.

*Grupos que presentaron un animal no evaluable

nocido internacionalmente, los resultados tras el empleo de HEBERITRO® son factores que hablan a favor de la seguridad de nuestro producto.

Conclusiones

Los resultados del empleo de HEBERITRO® indican que no es un agente tóxico ni provoca reacciones locales en el sitio de administración a dosis superiores a la terapéutica y posee un adecuado marco de seguridad para ser empleado en el estudio clínico en pacientes.

Los resultados durante la fase experimental y el estudio histopatológico determinaron la semejanza en la respuesta biológica a los productos HEBERITRO® y EPREX®.

36. Fox JG, Cohen BJ, Loew FM (eds). Laboratory Animal Medicine. Ch4 Biology and Diseases of rats. ACLAM Series, Academic Press Inc;1984.

37. Greaves P. Histopathology of Pre-clinical Toxicity Studies. Interpretation and relevance in Drug Safety Evaluation. Second Edition. ELSEVIER;2000.

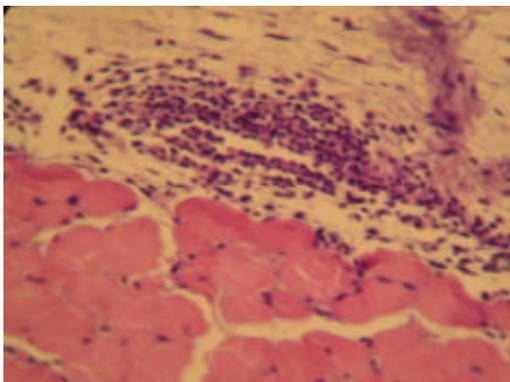


Figura 3. Reacción focal discreta, a las 24 h en el grupo V (60 veces la dosis terapéutica).

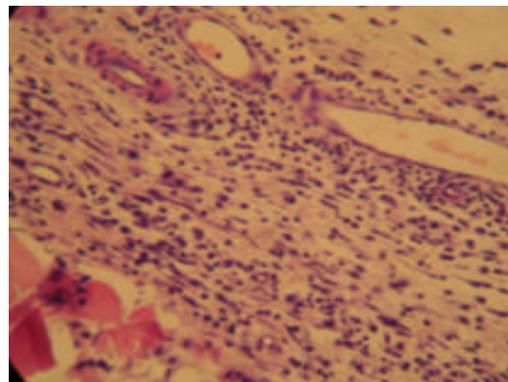


Figura 4. Reacción focal moderada, a los 7 días en el grupo I (placebo).