

Evaluación de la seguridad del factor estimulador de colonias de granulocitos producido por el CIGB

Lizet Aldana¹, Dania Bacardí¹, Nelson Merino², Karelía Cosme¹, Delia Porras¹, Irma Carreras¹, Alfonso Alí¹, José Suárez¹, Ariel Vázquez¹, Yaí Cruz¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53-7) 271-8070, 336008; E-mail: lizet.aldana@cigb.edu.cu

²Departamento de Anatomía Patológica, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana
Calle 222 y Ave. 23, La Coronela, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN

El G-CSF humano es un factor estimulador de colonias específico de linaje, producido por monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Esta citoquina regula la producción de neutrófilos funcionales de la médula ósea y puede producir incrementos marcados del conteo de neutrófilos en sangre periférica en 24 horas. A partir de la obtención en Cuba de G-CSF (HEBERVITAL) por tecnología de ADN recombinante se diseñó un panel de estudios preclínicos con el objetivo de evaluar su seguridad antes de su empleo en estudios clínicos. El HEBERVITAL fue administrado en ratas Sprague Dawley durante un estudio de toxicidad aguda, en el cual se comparó con un similar comercial de la firma Amgen Inc., California, NEUPOGEN® y en un estudio de tolerancia local. En el estudio agudo se suministró a los animales dosis superiores a la dosis terapéutica, con niveles 150, 300 y 450 veces superiores a ésta. La tolerancia local incluyó, por su parte, la dosis terapéutica y niveles 3 y 10 veces superiores a ésta. Cada estudio incluyó un grupo placebo como control. No se reportaron signos de toxicidad, ni alteraciones morfológicas. Se observó una reacción local caracterizada fundamentalmente por la aparición de tejido de granulación subcutáneo como mecanismo de reparación; resultados similares a los reportados para los animales inoculados con NEUPOGEN®. Concluimos que en el espectro de dosis explorado en ratas Spague-Dawley, el HEBERVITAL administrado por vía subcutánea es clasificado como no tóxico y tolerable.

Palabras claves: factor estimulador de colonias específico de linaje, GCS-F, seguridad, toxicidad

Biotecnología Aplicada 2005;22:45-49

ABSTRACT

Safety evaluation of granulocyte colony-stimulating factor obtained in CIGB. Human G-CSF is a lineage specific colony stimulating factor, which is produced by monocytes, fibroblast and endothelial cells. G-CSF regulates the production of neutrophils from the bone marrow, and it is able to markedly increase the amount of neutrophils in peripheral blood in a 24-hour period. A panel for preclinical studies was designed to evaluate the safety of HEBERVITAL (G-VCSF obtained in Cuba by recombinant DNA technology), before its use in clinical studies. It was used in toxicological assays (acute single doses and local tolerance). HEBERVITAL was administered to Sprague-Dawley rats in an acute toxicity study (in which it was compared with NEUPOGEN®, a commercially available product manufactured by Amgen Inc.) as well as in a local tolerance study. Doses that were 150, 300 and 450 times higher than the therapeutic dose were inoculated in the Acute Toxicity study. The local tolerance study included the therapeutic dose and levels 3 and 10 times higher than that. A control group inoculated with placebo was also included in each study. In fact, no signs of toxicity or histopathologic changes were shown. A local reaction was reported, characterized by subcutaneous granulation tissue as a restoring mechanism. The same finding was reported in animals inoculated with NEUPOGEN. It was concluded that HEBERVITAL is not toxic, and it is well tolerated through the subcutaneous route in the tested dose in Spague-dawley rats.

Keywords: lineage specific colony stimulating factor, GCS-F, safety, toxicity

Introducción

El factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) es una proteína de 174 aminoácidos, con un peso molecular de 18-22 kDa [1], cuyo gen se encuentra localizado en la región q21-22 del cromosoma 17. Su estructura está formada por hélices antiparalelas, presentando además dos puentes disulfuro entre las cisteínas C₃₉-C₄₅ y C₆₇-C₇₇ y una glicosilación en la treonina 133, que contribuye a su estabilidad. Los factores estimuladores de colonias actúan mediante su enlazamiento a sus receptores celulares de 140 kDa [1-4].

El uso de tecnologías de ADN recombinante ha permitido la producción a gran escala de este factor. El G-CSF es obtenido mediante la inserción del gen humano que lo codifica en la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*),

luego de lo cual es purificado siguiendo las buenas prácticas de producción para productos biofarmacéuticos [5]. De esta forma es producido G-CSF en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba), el cual se reconoce con el nombre comercial de HEBERVITAL.

Su uso más extensamente estudiado es la aplicación en la neutropenia inducida por la quimioterapia y en la neutropenia crónica. Se conoce que además el G-CSF acelera la recuperación neutrofílica después de los trasplantes de médula ósea y en pacientes con leucemias agudas. También se plantean posibles usos en pacientes con cáncer metastásico de mamas, mielomas múltiples, síndrome de Felty, infecciones bacterianas y en

1. Burke F, Naylor MS, Davies B, Balkwill F. The cytokine wall chart. *Immunology Today* 1993;14(5):165.

2. Hamilton JA. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages-some controversies. *Immunology Today* 1993;14(1):18-24.

3. Fresno M, Kopf M, Rivas L. Cytokines and infectious diseases. *Immunology Today* 1997;19(3):57.

4. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunology Today* 1997;18(7):343-50.

pacientes con SIDA [6-8]. Por otra parte, se estudia la posibilidad de utilizarlo en terapias combinatorias con otras citoquinas en diversas afecciones. La dosis de tratamiento más empleada es de 5 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea [6].

El G-CSF ha sido empleado en numerosos estudios preclínicos y clínicos. NEUPOGEN® (G-CSF producido por la firma Amgen Inc., California) ha sido administrado a primates no humanos, perros, hamsters, ratas y ratones en estudios toxicológicos agudos, subagudos y crónicos [9-11], demostrando adecuada seguridad para su empleo en humanos. En estudios clínicos, se ha observado un incremento dosis dependiente de los conteos de neutrófilos circulantes al emplear rangos de dosis de 1 a 70 mg/kg/día, así como algunos efectos adversos que no han impedido su empleo terapéutico [7, 8, 12].

A la luz de estos resultados, y dada la importancia de contar en el mercado con un producto como el HEBERVITAL, se pretende realizar en Cuba estudios clínicos, antes de lo cual es necesario evaluar su seguridad empleando animales de laboratorio. Para ello fueron diseñados estudios de toxicidad aguda y tolerancia local, cuyos resultados son expuestos en el presente trabajo.

Materiales y métodos

Los estudios se llevaron a cabo según las normas éticas descritas para el uso de animales de experimentación [13], siguiendo las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio [14,15] y los Procedimientos Patrones de Operación aprobados para la realización de estudios toxicológicos.

Animales de ensayo

Se utilizó la sublínea de ratas C57BL/6J (Sprague-Dawley) suministrada por la división de roedores gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). A su llegada a la instalación, los animales fueron clínicamente examinados, pesados y alojados de forma individual en cajas de makrolón (Tecniplast, Italia) 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 luz-oscuridad de 12 horas), las cuales permanecieron constantes durante la fase experimental. El alimento (ALY co, CENPALAB) fue suministrado diariamente a razón de 25 g por animal y el agua fue suministrada *ad libitum*.

Para el estudio de toxicidad aguda fueron seleccionadas 50 ratas, entre 5 y 6 semanas de edad, 25 de cada sexo con peso promedio de 134.75 g ± 0.55. En el estudio de tolerancia local se utilizaron 40 ratas machos jóvenes adultos, los que al inicio del experimento contaban con una media de peso corporal de 158.08 g ± 2.6.

Formulación

En ambos estudios se emplearon lotes de HEBERVITAL producidos en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba), obtenidos con un 99% de pureza (HPLC-RP), actividad biológica de 70.4 x 10 UI/mL y concentración de proteínas (Lowry)

de 0.39 mg/mL. Se confirmó además, la esterilidad, apirogenicidad, pH, volumen y estabilidad de este producto. El NEUPOGEN, producido por Amgen Inc. fue obtenido de un lote comercial.

Evaluación de la toxicidad aguda. Estudio comparativo con NEUPOGEN

Diseño experimental

Este estudio fue diseñado siguiendo las regulaciones emitidas por ICH/EMEA (International Conference on Harmonization/European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) [16, 17]. Se confeccionaron cinco grupos de trabajo con 10 animales cada uno, 5 de cada sexo, a los cuales se les aplicó, mediante administración parenteral por vía subcutánea, los tratamientos mostrados en la (Tabla 1).

Una vez administrados, los animales fueron observados diariamente, 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 [18] e incluyeron cambios en piel y pelaje, coloración y apariencia de las membranas mucosas y ojos, sistema respiratorio, nervioso central y autónomo y actividad somatomotora. Se realizó la medición del peso corporal los días 1, 7 y 14 del estudio y se cuantificó el consumo de alimento con una frecuencia diaria.

El día 14 del estudio, a los animales se les practicó eutanasia mediante dislocación cervical previo tratamiento anestésico con éter y fueron desangrados por un corte en la arteria femoral. Durante la necropsia se realizó la observación macroscópica de todos los órganos y se tomaron muestras de hígado, bazo, ganglios mesentéricos y sitio de administración para la evaluación histopatológica. Estas muestras fueron procesadas utilizando tinción hematoxilina-eosina y observadas utilizando un microscopio Olympus (Japón).

Evaluación de la tolerancia local

Diseño experimental

El estudio fue diseñado siguiendo aspectos descritos en la guía ICH/EMEA 2145/00 [19]. Se confeccionaron cuatro grupos de tratamiento con 10 animales cada uno, según se refleja en la Tabla 2.

Los animales fueron administrados por vía subcutánea 7 días consecutivos, con excepción de 5 de cada grupo que se sacrificaron el día 2 del estudio, luego de solo una inoculación de HEBERVITAL. Se puso especial énfasis durante las observaciones clínicas diarias en la búsqueda de daños locales atribuibles a la sustancia de ensayo. Para realizar el sacrificio se siguió el procedimiento descrito anteriormente e igualmente se llevó a cabo la observación macroscópica y la toma

5. Tatsuda D, Aimura H, Tokunaga H, Ishibashi M, Arakawa T, Tokunaga M. Expression and purification of cytokine receptor homology domain of human G-CSF receptor fusion protein in *E. Coli*. *Protein Expr Purif* 2001;21(1):87-91.

6. Neidhart J, Mangalik A, Kohler W, et al. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates recovery of granulocytes in patients receiving dose-intensive chemotherapy without bone-marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1989;7:1685-91.

7. Gabrilove JL, Jakubowski A, Fain K, et al. Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest* 1988;82:1454-61.

8. Morstyn G, Souza L, Keech J, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* 1988;1:667-72.

9. Neupogen®. Product Information. Amgen Inc., California. On line: [www/neupogen.com](http://www.neupogen.com). 2002.

10. Zsebo KM, Cohen AM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Molecular and biological characterization. *Immunobiol* 1986;172:175-84.

11. Welte K, Bonilla MA, Gillio AP, et al. Recombinant human G-CSF: Effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide treated primates. *J Exp Med* 1987;165:941-8.

12. Bronchud MH, Scarffe JH, Thatcher N, et al. Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1987;56:809-13.

13. Guidelines for breeding and care of laboratory animals World Health Organization and International Council for Laboratory Animals Science (ICLAS). 1998.

14. Food and drug administration. Good Laboratory Practice for non clinical laboratory studies. Title 21 Code of Federal Regulations, Subchapter A, Part 58, 1997.

15. Programa para el uso de animales de experimentación del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. UBioterio, CIGB, 1998.

16. ICH/EMEA. Preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, Step 4, (CPMP/ICH/302/95); 1997.

17. ICH/EMEA. No-clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (M) (modification of CPMP/ICH/286/95), 2000.

Tabla 1. Grupos de tratamientos en el estudio de toxicidad aguda

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)
I	Placebo	-
II	150 veces la dosis terapéutica de HEBERVITAL	0.75
III	300 veces la dosis terapéutica de HEBERVITAL	1.50
IV	450 veces la dosis terapéutica de HEBERVITAL	2.25
V	450 veces la dosis terapéutica de NEUPOGEN	2.25

de muestras del hígado, bazo, ganglios mesentéricos y sitio de administración para el estudio histopatológico.

Se registró el peso corporal de forma individual los días 0 y 8 del estudio y el consumo de alimento fue medido diariamente.

Procesamiento de datos

Las variables usadas para el tratamiento estadístico fueron el peso corporal (PC), el consumo promedio semanal de alimentos (CA) y los hallazgos histopatológicos (HH). En todos los casos se estimaron las medidas de tendencia central y dispersión (media, desviación estándar, valores máximos y mínimos.)

Para los análisis de PC y CA se verificaron los supuestos de normalidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) en cada tiempo de evaluación y para cada sexo, aplicándose Análisis de varianza (ANOVA) paramétrico o la alternativa no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis). Se realizaron comparaciones pareadas en los intervalos consecutivos, utilizando la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon, en función del cumplimiento del supuesto de aproximación por una distribución normal. Los datos resultantes del estudio histopatológico fueron analizados a través de la construcción de las tablas de clasificación cruzadas, con la prueba de independencia asociada (prueba exacta de Fisher) [20]. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 8.0 sobre Windows [21].

Resultados

Observaciones clínicas

En las observaciones clínicas realizadas diariamente en el estudio de toxicidad aguda no se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos. No se reportaron cambios en el pelaje; la coloración, apariencia de ojos y membranas mucosas fue normal, así como la actividad somatomotora y el comportamiento, observándose adecuada respuesta ante los estímulos. No se registraron muertes. En el estudio de tolerancia local en el sitio de administración no se observaron eritemas y/o edemas ni ningún otro signo atribuible a la administración de HEBERVITAL.

Peso corporal

En el estudio de toxicidad aguda se evidenció ganancia de peso en el tiempo al comparar los resultados obtenidos para los tiempos 0 y 14 días, aunque se debe señalar que los animales hembras mostraron disminución en este parámetro durante la segunda semana, lo cual no fue observado en los animales machos, que aumentaron de manera sostenida su peso corporal (Tabla 3). Se analizó, además, el comportamiento de este parámetro en función de la dosis administrada en cada tiempo de evaluación, evidenciándose que no existieron diferencias significativas entre los grupos (día 7, $p = 0.089$; día 14, $p = 0.075$).

En el caso de la tolerancia local se evidenció un incremento significativo en este parámetro en el período de evaluación, sin que se reportaran diferencias significativas entre grupos para un mismo tiempo de pesaje, indicando igualmente que la

Tabla 2. Grupos de tratamiento en el estudio de tolerancia local

Grupo	Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
I	Placebo	-
II	dosis terapéutica de HEBERVITAL	5
III	10 veces la dosis terapéutica de HEBERVITAL	50
IV	30 veces la dosis terapéutica de HEBERVITAL	150

Tabla 3. Peso corporal (g) en hembras y machos. Estudio de toxicidad aguda

Grupo	Día 1		Día 7		Día 14	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
I	131.4 \pm 5.86	139.2 \pm 7.60	195.4 \pm 5.59	164.8 \pm 5.45	172.0 \pm 12.1	210.8 \pm 11.5
II	130.6 \pm 6.66	138.0 \pm 8.00	194.8 \pm 6.06	165.2 \pm 6.42	167.4 \pm 6.43	210.4 \pm 6.43
III	130.0 \pm 4.18	139.2 \pm 6.69	196.0 \pm 5.92	167.6 \pm 5.77	173.4 \pm 7.09	214.2 \pm 9.34
IV	131.4 \pm 7.70	138.4 \pm 9.45	200.6 \pm 4.04	168.8 \pm 4.97	172.4 \pm 10.7	212.2 \pm 5.26
V	130.8 \pm 6.30	139.4 \pm 10.5	198.4 \pm 3.91	162.6 \pm 6.99	170.2 \pm 9.73	203.4 \pm 4.72

variación en la dosis no incidió sobre la ganancia de peso corporal (Tabla 4).

Consumo de alimentos

En ambos estudios el consumo de alimento se mantuvo dentro de los rangos establecidos para animales sanos de la especie (entre 17 y 25 g/día) [22]. En el estudio comparativo entre HEBERVITAL y NEUPOGEN no se observaron diferencias en este parámetro entre los animales inoculados con ambos productos, aunque en los machos, al igual que en las hembras, se evidencia un consumo oscilante de alimentos con un aumento del mismo en la segunda semana. Posteriormente, el consumo se mantuvo estable, siempre dentro del rango antes mencionado.

Evaluación macroscópica e histopatológica

En las observaciones macroscópicas realizadas durante la necropsia en ambos estudios, no se evidenciaron alteraciones en los órganos y tejidos inspeccionados, con excepción de la presencia de sitios hemorrágicos locales observados en animales incluidos en el estudio de tolerancia local, y que son resultado del trauma por inoculación.

En la evaluación histopatológica los resultados fueron muy similares en ambos estudios. En el estudio de toxicidad aguda se observó discreta hepatitis reactiva con hiperplasia de las células de Kupfer y agregados focales de células inflamatorias mono-nucleares (Figura 1), hallazgo que se reportó en 2 animales de los grupos I y II, 3 del grupo III, 5 del grupo IV y 6 animales del grupo V.

Tabla 4. Peso corporal (g) de los animales del estudio de tolerancia local

Grupo	Día 1	Día 7	p
I	156.80 \pm 13.08	170.60 \pm 22.30	0.043
II	157.00 \pm 10.65	167.40 \pm 7.27	0.015
III	156.60 \pm 12.70	167.60 \pm 15.81	0.004
IV	162.00 \pm 11.07	174.20 \pm 12.46	0.039

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

19. ICH/EMEA (2001). Note for Guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products CPMP/SWP/2145/00. Animal use and toxicity evaluation. Victor S and Lucas JR ed, New York, 1994, p. 29.

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

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

22. Victor S. Animal use and toxicity evaluation. Lucas JR(ed) 1994, p. 29.

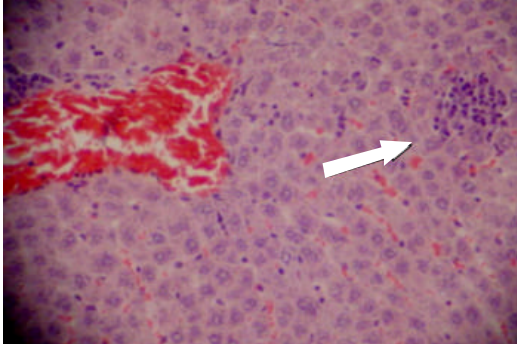


Figura 1. Hepatitis reactiva reportada en el estudio de toxicidad aguda. Se observan agregados linfoides focales (flecha) 100X.

Se observó además en todos los grupos de tratamiento hiperactividad linfóide en bazo y ganglios linfáticos con centros germinativos activos.

En el estudio de tolerancia local, los hallazgos histopatológicos en el sitio de administración pueden ser analizados en dos momentos, a las 24 horas después de la primera administración y el día 8 del estudio, transcurridas 7 inoculaciones sucesivas de HBERVITAL por vía subcutánea.

Los hallazgos reportados a las 24 horas aparecen en la Tabla 5, donde puede observarse que en la mayoría de los animales no se presentaron alteraciones locales. En la Figura 2 se observan los principales efectos encontrados.

En la evaluación histológica realizada, transcurridas 7 administraciones de HBERVITAL, se pudo observar que no existieron efectos adversos locales atribuibles a la sustancia de ensayo o al placebo de la formulación. En ninguno de los grupos se observó daño hepático. En todos los grupos se destaca una hiperplasia linfóide, más evidente en los ganglios linfáticos con expansión del paracortex y formación de centros germinativos activos (Figura 3). En la valoración de la capacidad irritativa sobre el tejido muscular no se observaron signos de daño atribuibles al G-CSF.

Discusión

En el estudio de toxicidad aguda y en el de tolerancia local los animales no presentaron signos de toxicidad ni alteraciones en el comportamiento. Los parámetros consumo de alimento y peso corporal presentaron variaciones, fundamentalmente en los animales hembras, pero éstas no representan alteraciones de consideración biológica, toda vez que los animales de manera general aumentaron de peso y consumieron alimento dentro del rango que se reporta para animales sanos de la especie (entre 17 y 25 gramos) [22]. En las observaciones clínicas solo se reportaron hallazgos en los animales pertenecientes al estudio de tolerancia local (focos hemorrágicos), y éstos estuvieron referidos al método y reiteración de la administración y no a la sustancia en estudio, ya que se presentó incluso en los animales administrados con el placebo.

Las señales de estrés inmunológico y celular observadas en el sitio de administración correspondieron solo a los animales del mencionado estudio, en el cual el HBERVITAL fue administrado reiteradas veces.

Tabla 5. Hallazgos microscópicos reportados en el sacrificio realizado a las 24 h después de la administración

Grupos	Sin alteraciones	Tejido de granulación subcutáneo	Reacción inflamatoria local	Necrosis
I	1/5	0/5	3/5	1
II	4/5	0/5	1	0
III	2/5	1/5	3*	0
IV	2/5	2/5	2*	0

* Reacción inflamatoria local en el sitio de administración en fase reparativa del daño inicia

Se observó un patrón de reacciones inflamatorias provocadas, en nuestro criterio, por el daño consecuente de administrar elevados volúmenes y altas dosis del producto de prueba, lo cual coincide con otros autores, que han señalado focos hemorrágicos con infiltrados linfoides luego de administrar altas dosis de G-CSF [9, 10].

En el estudio de toxicidad aguda se debe destacar que los hallazgos reportados fueron coincidentes para los grupos administrados con HBERVITAL y NEUPOGEN®. La respuesta hepática parece estar relacionada con el mecanismo propio de acción farmacológica del G-CSF, puesto que la presencia de agregados focales mononucleares y la hiperplasia de

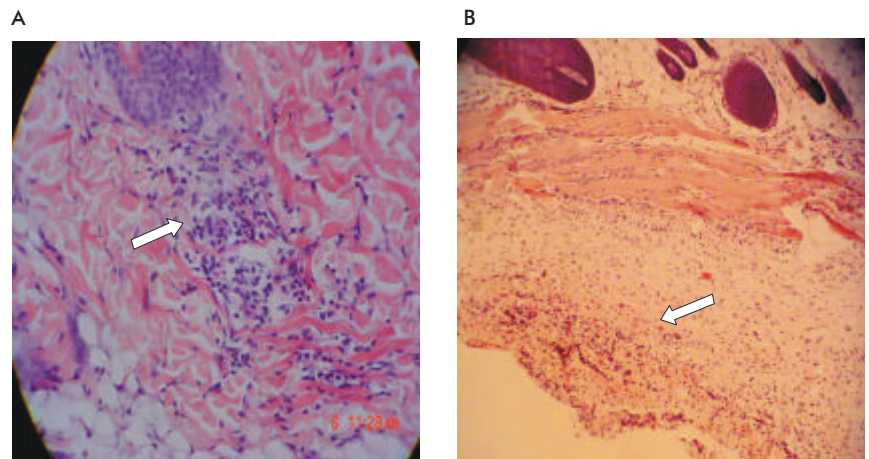


Figura 2: Hallazgos microscópicos reportados en el estudio de tolerancia local. A: Reacción inflamatoria en la dermis (flecha); B:Tejido de granulación subcutáneo (flecha). (100X)

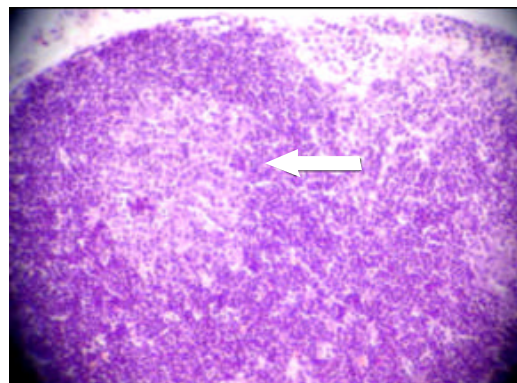


Figura 3. Estudio de tolerancia local. Hiperplasia linfóide en ganglio linfático mesentérico. Se observa centro germinativo (flecha) (100X).

las células de Kupffer aumenta en frecuencia con la dosis. En estudios realizados con varias especies el exámen histopatológico del hígado revelaron incrementos de la granulopoyesis extramedular e hiperplasia como respuesta a la acción farmacológica del G-CSF [9].

La respuesta esplénica aumentada y la hiperreactividad linfoide observada en ganglios linfáticos y bazo de animales pertenecientes al estudio de tolerancia local coincide con lo reportado en otros estudios [10, 11], en los cuales se observó hiperplasia de bazo e hígado como resultado de la granulopoyesis extramedular dosis dependiente inducida por el G-CSF.

En general, nuestros hallazgos tanto locales como sistémicos no se consideran signos tóxicos y son, al parecer, consecuencia de los altos niveles de dosis administrada, como aparece referido en la literatura acerca del tema [3, 4, 6]. Además, el hecho de que en

la mayoría de los animales no se presentaron alteraciones también es un factor que habla en favor de la seguridad de esta sustancia. El HEBERVITAL mantuvo un patrón de respuesta similar al obtenido con NEUPOGEN[®], producto éste que ha sido registrado en numerosos países con alto impacto terapéutico y comercial.

Conclusiones

Nuestros resultados permiten concluir que HEBERVITAL, en el espectro de dosis explorado produce efectos propios de su mecanismo de acción en órganos como hígado, ganglios linfáticos, bazo y sitio de administración que no se traducen en signos de toxicidad. A pesar de las diferencias en las formulaciones de HEBERVITAL y NEUPOGEN[®], los resultados obtenidos durante la fase experimental y en el estudio histopatológico fueron semejantes.

Recibido en diciembre de 2003. Aprobado en octubre de 2004.