



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**PRUEBAS PRECLÍNICAS PARA EVALUAR LA EFICACIA  
Y SEGURIDAD DE UN BIOCOMPARABLE DE RITUXIMAB  
(ANTICUERPO MONOCLONAL QUIMÉRICO) PARA EL  
TRATAMIENTO DE LINFOMA NO HODGKIN DE  
CÉLULAS B**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA**

**SERGIO DANIEL GÓMEZ GÓMEZ**

**TUTOR: MARÍA ISABEL GRACIA MORA  
COMITÉ TUTORAL: LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO  
LUIS ENRIQUE GARCÍA ORTUÑO**

**México, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores por todo su apoyo, el cual siempre ha sido incondicional.

A laboratorios Probiomed por la confianza y apoyo para la realización del trabajo.

A CONACYT y la Dirección General de Estudios de Posgrado UNAM por la beca de maestría.

## **RESUMEN**

A nivel mundial cobra importancia el desarrollo no sólo de nuevos medicamentos, sino de farmoquímicos genéricos intercambiables y biotecnológicos biocomparables, para hacer más asequibles a la población nuevas alternativas terapéuticas. La vinculación Academia-Industria puede coadyuvar al desarrollo de estas alternativas, facilitando el proceso de la innovación. Como ejemplo de lo anterior, en este estudio se evaluó un biocomparable de rituximab, el cual es un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano que se une a la proteína CD20 presente en linfocitos B maduros, produciendo apoptosis. Para evidenciar la eficacia del biocomparable y la ausencia de efectos tóxicos, se realizaron estudios en cultivos de células Pfeiffer y de linfocitos humanos sanos para evaluar la expresión de diferentes moléculas por medio de inmunocitoquímica y su correlación con el porcentaje de apoptosis por medio de TUNEL, así como la proliferación celular por medio de MTT. Se hizo un estudio de toxicidad aguda en ratones confrontando diferentes dosis del biocomparable con el innovador y, en ratas con diferentes dosis del biocomparable. Se realizaron estudios de toxicidad subcrónica en ratones con diferentes dosis del biocomparable. También se midió la concentración sérica de ambos biotecnológicos durante 7 días en ratas por medio de la prueba de ELISA de captura. Las pruebas de eficacia mostraron la misma efectividad entre ambos compuestos. En las pruebas de toxicidad no se encontró ninguna alteración ni en el comportamiento ni en la salud física de los sujetos de experimentación. Con este estudio podemos concluir que ambos biotecnológicos presentan buena efectividad contra linfocitos B, ninguna toxicidad hacia órganos y tejidos en 90 días y apropiados niveles en sangre durante 7 días, además no hay evidencia estadística para afirmar que existen diferencias entre ambos.

Palabras clave: anticuerpo monoclonal, biocomparable, CD20, linfocitos B, rituximab.

## **ABSTRACT**

The development not only of new medicines, but generics and biosimilars, is getting more importance worldwide in order to make them more accessible to the population. The collaboration between academia and industry is crucial in this activity. As example, in this study we evaluated a biosimilar of rituximab, a mouse-human chimeric monoclonal antibody that joins to CD20 protein present in mature B lymphocytes, inducing apoptosis. To prove the efficacy of the biosimilar and the absence of its toxic effects, we performed studies on Pfeiffer cell cultures and on healthy human lymphocytes to evaluate the expression of different molecules by immunocytochemistry and its correlation with the apoptosis rate by TUNEL, as well as the cell proliferation by MTT. Acute toxicity studies were made in mice comparing different doses of the biosimilar with the innovator and, in rats with different doses of the biosimilar. Subchronic toxicity studies were also made on mice at different doses with the biosimilar. We also measured serum concentration in rats of both biotech for 7 days by ELISA. The efficacy tests showed the same effectiveness between both antibodies. On toxicity studies, we found that none of the compounds produced any alteration on the rodent's behavior or on their physical health. We conclude that both biotech produce good efficacy against B lymphocytes, none toxicity to organs and tissues in 90 days and appropriate levels in blood during 7 days. Non statistical differences were found.

Key words: monoclonal antibodies, biosimilar, CD20, B cells, rituximab.

## ÍNDICE

### **1. INTRODUCCIÓN**

- 1.1 Clasificación de linfomas.
- 1.2 Tratamiento convencional.
- 1.3 Antecedentes de los anticuerpos monoclonales.
- 1.4 Rituximab.
- 1.5 Legislación para biocomparables.
- 1.6 Estudios preclínicos.
  - 1.6.1 Estudios de toxicidad aguda.
  - 1.6.2 Estudios de toxicidad subcrónica.
- 1.7 Estudios clínicos.

### **2. JUSTIFICACIÓN**

### **3. HIPÓTESIS**

### **4. OBJETIVOS**

- 4.1 Objetivo general.
- 4.2 Objetivos específicos.

### **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

- 5.1 Farmacodinamia.
  - 5.1.1 Inhibición de crecimiento celular.
  - 5.1.2 Expresión de moléculas Ki67, Bcl-2, Bax y Caspasa 3.
  - 5.1.3 Expresión de apoptosis.
- 5.2 Toxicidad aguda.
- 5.3 Toxicidad subcrónica.
  - 5.3.1 Hematología.
  - 5.3.2 Bioquímica.
  - 5.3.3 Urianálisis.
  - 5.3.4 Necropsias.
  - 5.3.5 Histopatología.
- 5.4 Niveles séricos.

5.5 Análisis estadístico.

## **6. RESULTADOS**

6.1 Inhibición de crecimiento celular.

6.2 Expresión de moléculas Ki67, Bcl-2, Bax y Caspasa 3.

6.3 Expresión de apoptosis.

6.4 Toxicidad aguda.

6.5 Toxicidad subcrónica.

6.5.1 Hematología.

6.5.2 Bioquímica.

6.5.3 Urianálisis.

6.5.4 Necropsias.

6.5.5 Histopatología.

6.6 Farmacocinética.

## **7. DISCUSIÓN**

## **8. CONCLUSIONES**

## **9. ANEXOS**

## **10. REFERENCIAS**

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros clínicos revisados diariamente durante 14 días, luego de la administración única con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y MabThera<sup>®</sup> por vía intravenosa e intraperitoneal en ratas y ratones de ambos sexos.

Cuadro 2. Órganos colectados para su estudio histopatológico, de ratones machos y hembras tratados semanalmente, durante 90 días con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa.

Cuadro 3. Resultados de los hemogramas de ratones machos y hembras, realizados al final del tratamiento semanal con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Cuadro 4. Resultados de las bioquímicas sanguíneas de ratones machos y hembras, realizadas al final del tratamiento semanal con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Cuadro 5. Resultados de los urianálisis de ratones machos y hembras, realizados al final tratamiento semanal con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Cuadro 6. Número de ratones machos y hembras tratados semanalmente con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, que presentaron hallazgos histológicos en sus diferentes aparatos o sistemas.

Cuadro 7. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con 740 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> por vía intravenosa durante 90 días.

Cuadro 8. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con 830 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> por vía intravenosa durante 90 días.

Cuadro 9. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con el vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup> por vía intravenosa durante 90 días.

Cuadro 10. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de proliferación de células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Figura 2. Porcentaje de expresión de Ki67 en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Figura 3. Porcentaje de expresión de Bcl-2 en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Figura 4. Porcentaje de expresión de Bax en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Figura 5. Porcentaje de expresión de Caspasa 3 en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Figura 6. Porcentaje de apoptosis en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Figura 7. Peso de ratones de ambos sexos al día 0, 1, 7 y 14, luego de la administración única con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup> por vía intravenosa e intraperitoneal, siendo el día 0 el día que se recibieron los animales y el día 1 el día de la administración.

Figura 8. Peso de ratas de ambos sexos al día 0, 1, 7 y 14, luego de la administración única con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup> por vía intravenosa e intraperitoneal, siendo el día 0 el día que se recibieron los animales y el día 1 el día de la administración.

Figura 9. Medias marginales de anticuerpos anti-CD20 medidos diariamente en suero de ratas durante 7 días luego de administrar una dosis única de 740 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup> y, 0.5 mL del vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup>.

Figura 10. Curva estándar obtenida para determinar la concentración de anticuerpos anti-CD20 en suero de ratas.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Clasificación de linfomas

Las Sociedades Americana y Europea de Hematopatología, han reeditado las entidades descritas en la *Revised European-American Lymphoma Classification* (REAL) propuesta por el *International Lymphoma Study Group* en 1994, dando así lugar a la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicada en otoño del año 2001 y actualizada en 2008 (Swerdlow, 2008). Esta nueva clasificación está basada en información clínica, morfológica y fenotípica de linfomas, aunque incluye también las leucemias, extendiendo de esta forma el consenso a todo el campo de tumores de origen hematopoyético. La OMS reconoce 3 categorías principales de neoplasias linfocíticas basándose en la morfología y el linaje celular: neoplasias de células B, neoplasias de células T y de células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*), y linfoma de Hodgkin. En las categorías de células B y células T, se reconocen 2 subdivisiones: neoplasias de células precursoras y neoplasias maduras diferenciadas, dentro de las cuales existen más de 30 tipos diferentes (Jaffe, 2001). Inicialmente el linfoma no-Hodgkin (LNH) puede ser indoloro y aparecer silenciosamente, provocando síntomas progresivos, dependiendo de su localización. En muchos casos, sobre todo cuando la proliferación del tejido linfático se produce en órganos internos, suele descubrirse accidentalmente al realizar estudios con otros fines diagnósticos. La probabilidad de padecer un LNH aumenta con la edad y es más frecuente en hombres que en mujeres, asimismo, es más común entre la gente con deficiencias inmunitarias (Farreras, 2000). El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, del inglés *diffuse large B cell lymphoma*) es el subtipo histológico de LNH de células B más común (25%) de toda esta división de linfomas (Badín, 2010). La incidencia de los LNH se ha incrementado considerablemente en el último par de décadas, llegando a ser el quinto cáncer más frecuente en los Estados Unidos de Norteamérica (Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

## **1.2 Tratamiento convencional**

El *South Western Oncology Group* estableció mediante un estudio aleatorio de fase III, que la terapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) era la mejor opción para pacientes con estados avanzados de LNH que mostraban desarrollo histológico intermedio o alto al compararlo con las terapias m-BACOD (metotrexato a dosis bajas con leucovorin, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), pro-MACE-CytaBom (prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida y etopósido, continuando con citarabina, bleomicina, vincristina y metotrexato con leucovorin) y MACOP-B (metotrexato con leucovorin, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona y bleomicina), produciendo mayor mejoría en menor tiempo (Fisher, 1993). También se ha intentado la radioterapia con Zevalin<sup>®</sup> (ibritumomab tiuxetan) y Bexxar<sup>®</sup> (iodina tositumomab) para LNH refractario a rituximab, aunque se necesitan exámenes de dosis y varios juegos de imágenes que confirmen la distribución de los compuestos (Mihailović, 2010).

## **1.3 Antecedentes de los anticuerpos monoclonales**

Durante la década de los 1980`s, los anticuerpos monoclonales (MAB, del inglés *monoclonal antibody*) murinos, se convirtieron en proteínas recombinantes altamente utilizadas, que prometían revolucionar el tratamiento de muchas enfermedades gracias a su gran especificidad y homogeneidad, sin embargo, desarrollaron respuestas inmunes contra secuencias de las regiones constantes de los anticuerpos murinos. Esta respuesta se conoce como “human anti-mouse antibodies” (HAMA) y tiene diversas consecuencias, entre las que destacan artritis generalizada, eritema cutáneo, y falla renal, entre otros. Mediante tecnología de ADN recombinante se han modelado anticuerpos monoclonales con mayor proporción de proteína humana en su estructura, permitiendo el desarrollo de anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos monoclonales completamente humanizados (Aguillón, 2003).

## 1.4 Rituximab

El rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano que representa una inmunoglobulina glucosilada con la regiones constantes de la inmunoglobulina G1 (IgG1) humana y las secuencias de la región variable de las cadenas ligeras y pesadas murinas (Maloney, 1999; Wilson, 2000). Este anticuerpo se une al antígeno de membrana CD20 (Boye, 2003), el cual es una fosfoproteína no glucosilada de 33-37 kD que funciona como canal de calcio (Maloney, 2002) y es importante en la diferenciación y proliferación de linfocitos B humanos, en los cuales se expresa en el 95% (Aguillón, 2003), así como en el 90% de los linfocitos B tumorales (Goldsmith, 2010; Press, 1998).

Las principales ventajas que presenta el rituximab es que el CD20 no circula libremente en sangre y, aunque este antígeno no está presente en los precursores de los linfocitos B (Anderson, 1984; Press, 1999), no se internaliza tras la unión con el anticuerpo ni es eliminado de la superficie celular luego de unirse al mismo (Goldsmith, 2010; White 1998) inhibiendo la proliferación y diferenciación celular al regular su ciclo biológico. Una vez formado el complejo antígeno-anticuerpo, también se induce fragmentación de ADN nuclear produciendo señales directas de apoptosis (Weiner, 2010), la cual puede estar mediada por cambios en la concentración de calcio (Shan, 1998) y la activación de proteínas tirosina cinasas, principalmente la *lyk* y *fyn*, así como Caspasa 3 (Mathers, 2000). Otros mecanismos de acción son mediante el dominio Fab del rituximab que se une al antígeno CD20 restableciendo funciones efectoras inmunes para mediar la lisis celular vía dominio Fc con mecanismos como citotoxicidad mediada por complemento (Reff, 1994; Flieger, 2000) tras la unión de C1q (Ornust, 1999), y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por uno o más receptores Fcγ de la superficie de granulocitos, macrófagos y células NK (Maloney, 1996). Otra vía utilizada es la desgranulación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 presente en más del 70% de los pacientes con LNH folicular, mediante la producción de interleucina 10, de esta manera potencia el efecto combinado con la quimioterapia (Demidem, 1997; Alas, 2000; Flieger, 2000). La expresión del antígeno de superficie CD59 y, en menor grado del C55, ambos inhibidores del complemento, pudieran estar asociados a una baja susceptibilidad de las células B malignas

al rituximab, dando como resultado una disminución a la respuesta clínica (Golay, 2000; Bannerji, 2003).

Este MAB fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en diciembre de 1997 para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin (Aguillón, 2003) a una dosis de  $375 \text{ mg/m}^2$ , semanalmente durante 4 semanas (Kosists, 2000). En 1998 fue aprobado por la Agencia Europea de Evaluación de Medicinas (EMA) para tratar pacientes con LNH de células B CD20+ (Forero, 2003) bajo el nombre de Mabthera<sup>®</sup>. Para el año de 2002, su uso fue aprobado tanto en Estados Unidos como en Europa para el tratamiento contra linfomas más agresivos en conjunción con quimioterapéuticos estándar. Desde el año de 2003, se utiliza para tratar pacientes con otras neoplasias, desórdenes linfoproliferativos posteriores a un trasplante, así como desórdenes autoinmunes, mostrando una mínima toxicidad (Aguillón, 2003). Gracias a la incorporación de rituximab como terapia estándar, se ha mejorado significativamente la sobrevivencia de pacientes con dos de los linfomas más frecuentes, como son el DLBCL en el caso de los más agresivos, y el del linfoma folicular, que es de los menos agresivos (Flowers, 2010). Incluso se ha demostrado que el uso de rituximab a  $600 \text{ mg/m}^2$  utilizada para pacientes con LNH de células B, asociado con ciclofosfamida induce una respuesta significativa en pacientes con artritis reumatoide (Leandro, 2001; Emery, 2006). La adición de rituximab a la quimioterapia estándar (CHOP) en pacientes con LNH de células B, es seguro y aumenta la relación de costo-beneficio durante la inducción y mantenimiento de terapias (Badin, 2010), al aumentar un 10% la sobrevivencia en pacientes de todas las edades con una mínima toxicidad clínica (Pettengel, 2003; Sehn, 2005). Desde 2008, se investiga la posibilidad de una inmunoterapia pasiva que pueda tener efecto positivo sobre la sobrevida libre de progresión y la sobrevida global del paciente, realizando investigaciones con base en el mecanismo propuesto de muerte de las células B malignas por este anticuerpo, mismo que podría considerar la presentación cruzada de antígenos del linfoma por las células presentadoras de antígeno y la preparación de las células T de linfomas antígeno-específicos (Hilchey, 2009).

El Kikuzubam<sup>®</sup> es un biocomparable de rituximab producido recientemente bajo las mismas características que Mabthera<sup>®</sup> y, en el presente estudio, se compararon ambos

compuestos por medio de diferentes ensayos con la finalidad de obtener información adecuada con respecto a la seguridad y eficacia del biocomparable.

### **1.5 Legislación para biocomparables**

La ley general de salud, en su Artículo 222 Bis considera como medicamento biotecnológico toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas. De igual modo, indica que los medicamentos biotecnológicos innovadores podrán ser referencia para los medicamentos biotecnológicos no innovadores, a los cuales se les denominará biocomparables (Ley General de Salud, 2010).

Para la obtención del registro sanitario de medicamentos biotecnológicos, el solicitante deberá presentar los estudios clínicos y, en su caso *in vitro* que sean necesarios para demostrar la seguridad, eficacia y calidad del producto. En caso de que no se hubieren emitido las disposiciones sobre los estudios necesarios y sus características a que hace referencia este artículo, los parámetros se definirán caso por caso, tomando en cuenta la opinión del Comité de Moléculas Nuevas (Ley General de Salud, 2010). Los medicamentos biotecnológicos deberán incluir en sus etiquetas el fabricante del biofármaco y su origen, el lugar del envasado y en su caso el importador (NOM-073).

La Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), terminó en abril de 2010 la versión final de la regulación para los medicamentos de última generación en el país. Esta nueva regulación define los lineamientos generales tanto para biotecnológicos innovadores como para biocomparables, pero para dar registro a cada biocomparable deberá crearse un subcomité que indique las pruebas clínicas requeridas para cada fármaco dado que son moléculas mucho más complejas que las de un fármaco químico. Para autorizar un innovador se pedirá toda la batería de estudios preclínicos y clínicos que demuestren eficacia y seguridad, los cuales pueden tardar 7, 8 ó 10 años. A los biocomparables se les requerirán ciertos estudios preclínicos ya sea *in vitro* o *in vivo* y

ciertos estudios clínicos en personas, que se podrán completar en 2 ó 3 años. Éste será el primer reglamento de biotecnológicos del mundo ya que en Europa hay lineamientos para cuatro biosimilares específicos, pero no un reglamento como tal (Coronel, 2010; González, 2007).

### **1.6 Estudios preclínicos**

El descubrimiento de un nuevo fármaco nace del conocimiento de un determinado proceso biológico, o bien de una sustancia con potencial terapéutico ya conocido (Bake, 1994). Al descubrir un compuesto con potencial terapéutico es necesario realizar ciertos estudios preclínicos y clínicos (Monge, 2001). Los estudios preclínicos son una serie de procedimientos necesarios que se realizan a un fármaco antes de ser utilizado en humanos y constan de dos grupos de procedimientos:

1. Estudios de síntesis química, análisis de impurezas y estabilidad en relación con el compuesto o la formulación a administrar.
2. Estudios farmacológicos, toxicológicos y de ADME (administración, distribución, metabolismo y excreción) destinados a investigar los efectos de la sustancia o su interacción con el organismo intacto. Estos deben evidenciar su efecto terapéutico y mecanismo de acción (Mayne, 1993; Gad, 2007).

Con respecto al primer grupo, el método de síntesis, las posibilidades de producción a escala industrial y el precio de la materia prima son elementos importantes a tener en cuenta al decidir la estrategia a seguir. La solubilidad y su estabilidad en forma sólida y en solución son factores esenciales para conseguir una formulación galénica adecuada. Dentro del segundo grupo, los estudios farmacológicos constan de los experimentos necesarios para poner en evidencia el supuesto efecto terapéutico y su mecanismo de acción. De forma complementaria se deben realizar estudios de seguridad que descarten los efectos indeseados sobre otros órganos o tejidos, así como posibles interacciones farmacológicas con otros fármacos. Toda actividad farmacológica potencial suele estar acompañada de efectos no deseados, en algunos casos claramente perjudiciales, por lo tanto, los estudios de toxicidad tienen una gran importancia en los programas de identificación y selección de los

compuestos a desarrollar. En la fase preclínica los estudios de ADME son de especial importancia para explicar los hallazgos farmacológicos o tóxicos. En este último contexto se denominan estudios toxicocinéticos (Bake, 1994; Monge, 2001; Collichio, 2003).

Los estudios en animales son fundamentales en la fase preclínica ya que proporcionan un perfil general de la toxicidad, la actividad farmacológica y la farmacocinética de un fármaco nuevo, sin embargo, incluso con esta información el inicio de los estudios clínicos es arriesgado. Existen muchos ejemplos de fármacos que pasaron todos los criterios preclínicos de inocuidad, pero que produjeron efectos adversos graves en los humanos. No sólo existen grandes variaciones de toxicidad entre las especies, sino que existen efectos adversos que no pueden detectarse en animales. Entre ellos se encuentran: somnolencia, náuseas, aturdimiento, nerviosismo, jaqueca, insomnio, fatiga, ardor de estómago, urticaria, etc. Debido a estas discrepancias, entre los datos obtenidos en animales y la respuesta en los humanos, los estudios clínicos iniciales sobre cualquier fármaco deben realizarse con mucho cuidado y con una metodología planificada cuidadosamente (Clark, 1993).

### **1.6.1 Estudios de toxicidad aguda**

La toxicología, es la ciencia que estudia los efectos nocivos provocados por los agentes químicos sobre un sistema biológico (Klasassen, 2003). En términos generales, con las pruebas toxicológicas se pretende investigar cómo es que las células de un organismo se pueden ver afectadas por la actividad tóxica de una estructura química determinada (Gutiérrez, 2001). Esto se realiza mediante la exposición de algunos animales de experimentación a dosis altas del agente tóxico con la intención de identificar posibles riesgos para humanos expuestos a dosis mucho menores (Klasassen, 2003), desgraciadamente los resultados de estas pruebas no pueden ser totalmente extrapolados al humano, dadas las diferencias propias de cada especie (Bakke, 1994; Gutiérrez, 2001).

Hay mucha polémica acerca de los aspectos éticos de la experimentación con animales, sin embargo, los estudios de toxicidad, como requisito previo a la realización de estudios clínicos en humanos para el registro de nuevos fármacos, siguen siendo obligatorios en todo el mundo y hasta el momento no existen alternativas que los puedan sustituir. Los estudios

de toxicidad se deben realizar en tres especies animales diferentes, dos roedores y una no roedor (Bakke, 1994). Dichos estudios buscan principalmente demostrar la seguridad del fármaco bajo condiciones de uso similares a las que se ha destinado, describir los signos y efectos asociados con su toxicidad, así como determinar el margen de seguridad (Post, 2004).

Los estudios de toxicidad aguda son análisis de efectos adversos ocurridos después de la administración o exposición de una sola dosis, generalmente alta (Rhodes, 2000; Giraldez, 2001) de alguna sustancia durante los primeros 14 días (Fort, 2002; Mayne, 1993). Estos estudios, se realizan con el fin de caracterizar los efectos biológicos agudos de un compuesto químico; no sólo su letalidad, sino también los órganos principalmente afectados y los signos clínicos, de manera que los pacientes intoxicados puedan ser diagnosticados y tratados de manera adecuada (Gutiérrez, 2001), además, proporcionan información de utilidad para el diseño y selección de las dosis en estudios de toxicidad más prolongados (Paine, 2000). Se puede administrar el fármaco por diversas vías, aunque la ruta que se escoge usualmente será la que se utilizará en la clínica (Fort, 2002). Las pruebas de toxicidad aguda también pueden ser convenientes para evaluar la toxicidad que puede ser causada entre la interacción entre 2 fármacos (Fort, 2002).

El número de animales requeridos para estas pruebas puede ser muy variable y dependerá del tipo de estudio, así como la especie utilizada, la disponibilidad de la misma, características de crecimiento, alimentación, facilidad de manejo, etcétera. Por cuestiones bioéticas es deseable utilizar el mínimo número de animales posibles para obtener la información requerida, en términos generales se considera que un número entre 2 y 6 animales puede ser adecuado para realizar estos estudios (Gutiérrez, 2001).

Los estudios preclínicos de toxicidad, son necesarios y tienen gran importancia en los programas de identificación y elección de los fármacos a desarrollar (Bakke, 1994) por tal razón, deben ser aplicados a todos los compuestos químicos que presenten algún interés de tipo biológico (Gutiérrez, 2001).

En el caso de los anticuerpos monoclonales que son generalmente seguros y bien tolerados, la toxicidad relacionada con el antígeno es predecible a partir de estudios preclínicos en un modelo animal relevante (Tabrizi, 2007).

### **1.6.2 Estudios de toxicidad subcrónica**

Estos estudios tienen una duración de 7 a 90 días, aunque pueden llegar a durar hasta 12 meses (FDA, 2003). Su objetivo es describir y definir la toxicidad asociada con aplicaciones repetidas de dosis altas, pero generalmente no letales, utilizando la vía de administración prevista para humanos. También sirven para encontrar rangos de dosis para estudios más largos. Usualmente se utilizan de 3 a 4 grupos de ratones expuestos a diferentes dosis y uno adicional como control, el tamaño de los grupos varía de 5 a 10 ratones/sexo/dosis. Diariamente se debe observar a los animales buscando signos clínicos y mortalidad, una vez por semana se deben hacer exámenes físicos, medir su peso corporal y el consumo de alimento; al terminar es deseable determinar la concentración de glucosa, compuestos nitrogenados, aspartato aminotransferasa (AST), alanin aminotransferasa (ALT), y fosfatasa alcalina (FA) en suero. Al finalizar el estudio debe realizarse una necropsia completa y seleccionar muestras de todos los tejidos, como glándulas adrenales, hueso, encéfalo, corazón, riñón, hígado, pulmón, testículos y timo, los cuales deberán previamente disecarse y pesarse, para posteriormente ser procesados para su examen histopatológico (Gad, 2007). Una desventaja de estos estudios es que casi nunca se puede determinar un potencial carcinogénico de una sustancia, debido al corto tiempo de la prueba (FDA, 2003).

### **1.7 Estudios clínicos**

Los estudios clínicos comienzan después de que se han generado suficientes datos para justificar las pruebas del nuevo fármaco en humanos (Page, 1998) y su principal finalidad es confirmar sus propiedades benéficas a través de los estudios preclínicos en animales (Moreno, 1993). La realización de estos estudios representan entre el 60-70% del tiempo y 30% del costo total de su desarrollo (Bakke, 1994).

Los estudios clínicos constan de cuatro fases y tienen como meta, encontrar la mejor vía de administración, el intervalo de dosis tolerada tanto en pacientes sanos como enfermos, farmacocinética y farmacodinamia, interacciones farmacológicas y, mantener una vigilancia dada la posibilidad de reacciones indeseadas en un bajo porcentaje de la población (Vos, 1991; Clark, 1993; Page, 1998).

1. Fase I: Aproximadamente el 50% de los compuestos probados en esta fase, se abandonan por toxicidad, por falta de eficacia o por ambas. Se inicia administrando dosis muy bajas a voluntarios para evaluar la toxicidad, determinar la mejor vía de administración, los límites posológicos más inocuos y, la determinación de la ADME en una población sana de entre 20 y 100 personas (Clark, 1993) aunque, si se trata del desarrollo de un fármaco muy tóxico, (antineoplásicos), la fase uno se realiza únicamente con pacientes enfermos (Cato, 2002).
2. Fase II: Luego de definir el intervalo de dosis tolerada, se procede a estudiar entre 100 y 200 pacientes en los que se considera que el nuevo fármaco pueda tener potencial benéfico (Clark, 1993; Moreno, 1993). El objetivo principal es presentar evidencias de que el fármaco presenta los efectos sugeridos por las pruebas preclínicas, así como investigar datos farmacocinéticos, relacionar las concentraciones plasmáticas con sus efectos y definir interacciones farmacológicas (Page, 1998).
3. Fase III: Se incluyen entre 250 y 1,000 enfermos, la población regularmente es más heterogénea (Clark, 1993). Aquí se determina si el uso crónico proporciona una relación favorable riesgo-beneficio y por otro lado, establece la utilidad del fármaco comparada con otras modalidades terapéuticas de eficacia probada (Moreno, 1993). Una vez que los estudios demuestran de forma satisfactoria que el fármaco es inocuo y eficaz se podrá aprobar para su distribución y uso (Clark, 1993).
4. Fase IV: Diversos efectos secundarios inusuales, pueden apreciarse únicamente tras el uso cotidiano por un gran número de pacientes, ya que pueden no detectarse efectos adversos graves que ocurren con frecuencias de 1 en 5,000 o incluso menos, es por esto que algunos fármacos se someten a vigilancia, en la que se reúnen

sistemáticamente datos de eficacia y toxicidad después de que el fármaco se ha comercializado (Clark, 1993; Vos, 1991).

En la actualidad la sociedad espera compuestos cada vez más seguros y eficaces, razón por la que el tiempo para el estudio de nuevos fármacos se incrementa, calculando que el tiempo necesario para que un compuesto pase del laboratorio de síntesis al mercado farmacéutico sea de aproximadamente 15 años (Monge, 2001). De igual forma se sabe que por cada 10,000 moléculas probadas sólo 10 alcanzan la etapa de notificación de medicamentos en fase de investigación clínica y es probable que de estas 10 moléculas sólo una se convierta en un medicamento nuevo (Velasco, 2003).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Es necesario en nuestro país el desarrollo de compuestos biocomparables de excelente calidad, sin embargo, antes de la administración terapéutica a un ser humano, debemos garantizar su eficacia, así como establecer su margen de seguridad.

## **3. HIPÓTESIS**

Dado que el biocomparable y el innovador son químicamente similares, ambos compuestos presentarán la misma eficacia para unirse a la proteína CD20, inducir apoptosis en linfocitos B sanos y tumorales sin producir efectos tóxicos secundarios y, mantener concentraciones similares en un organismo vivo.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

- ✓ Comprobar la seguridad y eficacia de Kikuzubam<sup>®</sup> y compararla con el innovador.

### **4.2 Objetivos específicos**

- ✓ Determinar el nivel de apoptosis y la expresión de moléculas de proliferación celular (Ki67), antiapoptósica (Bcl-2) y, proapoptósicas (Bax, Caspasa 3)

producida por Mabthera<sup>®</sup> y Kikuzubam<sup>®</sup> tanto en células tumorales, como en cultivos linfocíticos humanos de donadores sanos.

- ✓ Evaluar la posible toxicidad aguda de Mabthera<sup>®</sup> y Kikuzubam<sup>®</sup> en ratas y ratones, así como la toxicidad subcrónica de Kikuzubam<sup>®</sup> en ratones.
- ✓ Determinar la concentración sérica en ratas de Mabthera<sup>®</sup> y Kikuzubam<sup>®</sup> durante una semana.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

Estos estudios se realizaron bajo la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Química, así como del Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambas dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **5.1 Farmacodinamia**

Este conjunto de ensayos nos permite determinar la sobrevivencia de una población celular después de estar en contacto con un fármaco (Rode, 2004), de manera que se comparó la inhibición del crecimiento celular, mediante la expresión de una molécula de proliferación celular (Ki67), una antiapoptósica (Bcl-2) y dos proteínas proapoptósicas (BAX y Caspasa 3), correlacionándose con el porcentaje de apoptosis provocada por el tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup> tanto en células Pfeiffer (LNH de células B) como en linfocitos humanos aislados de sangre periférica de 5 donadores sanos. Todos estos estudios se realizaron en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química de la UNAM.

#### **5.1.1 Inhibición del crecimiento celular**

En cada ensayo se sembraron 20,000 células/pozo en placas de 96 pozos, por triplicado, cada placa realizada es una réplica independiente. Una vez sembradas las células, se adicionaron 20 µl del fármaco por pozo manteniendo una concentración final de 0.2, 2, 20 y 200 µg/ml tanto para Kikuzubam<sup>®</sup> como para MabThera<sup>®</sup>. Posteriormente fueron incubadas

a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 22 horas. Transcurrido este periodo se adicionaron 20 µl de sal de tetrazolio WST-1 (Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent; Clone Tech) dejando de nuevo en incubación por dos horas más, para finalmente leer la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 460 nm. Para cada fármaco, se determinó el porcentaje de sobrevivencia, considerando la proliferación máxima (100%) a los pozos que no recibieron tratamiento alguno.

### **5.1.2 Expresión de moléculas Ki67, Bcl-2, Bax y caspasa 3**

Se comparó el porcentaje de expresión de las proteínas Ki67 (proteína expresada durante proliferación celular), Bcl-2 (proteína antiapoptósica), Caspasa 3 y BAX (proteínas relacionadas con apoptosis), mediante inmunocitoquímica, tanto en células Pfeiffer como en linfocitos humanos aislados de sangre periférica de 5 donadores sanos y no fumadores. Se sembraron 20,000 células/pozo por duplicado en portaobjetos de 8 pozos. Una vez sembradas las células, se adicionaron 20 µL del biofármaco por pozo manteniendo una concentración final de 0.2, 2, 20 y 200 µg/mL tanto de Kikuzubam<sup>®</sup> como de Mabthera<sup>®</sup>. Posteriormente fueron incubados a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se aspiró el medio, se dejó secar al aire y se adicionaron 200 µL de una mezcla de etanol:ácido acético:agua (90:5:5) por 25 minutos para la correcta fijación de las células. Una vez fijadas las células, se rehidratan, sumergiéndolas en soluciones alcohólicas de diferente porcentaje (100%, 70%, 50%, 30%) y por último en una solución recuperadora de antígeno 1X pH 6.0. Una vez en dicha solución se les dio un tratamiento térmico en una olla de presión (120°C y 15 psi) durante 15 minutos, posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se lavaron con tris-buffer con tween 20 pH 7.6. Para el bloqueo de peroxidasa endógenas, se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se lavaron con tris-buffer con tween 20 pH 7.6 y se incubaron las muestras junto con el anticuerpo primario (Ki67, Bcl-2, Bax y Caspasa 3) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo se lavaron por 5 minutos con tris-buffer con tween 20 pH 7.6, a continuación se incubaron por 15 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado y 15 minutos con un anticuerpo terciario conjugado con peroxidasa, al término de este tiempo se lavaron de nuevo con el buffer antes mencionado y

se revelaron las inmunoreacciones con diaminobenzidina por 5 minutos, formando un producto final permanente de color café y siendo contrateñidas con hematoxilina durante 1 minuto. En el microscopio se contaron 100 células por tratamiento, considerando aquellas teñidas de color café como positivas y de color morado como negativas a cada una de las proteínas (Ki67, Bcl-2, Caspasa 3, Bax).

### **5.1.3 Expresión de apoptosis**

Las células pasaron por el mismo proceso descrito para la lectura inmunohistoquímica, hasta el bloqueo de peroxidasa, a partir de allí, se realizó el ensayo siguiendo las instrucciones incluidas en el “Manual de apoptosis, muerte y proliferación celular de Roche®”, aplicando la solución de reacción mixta de TUNEL por una hora a 37°C. Al término de este tiempo se lavaron las laminillas con tris-buffer y se adicionó el convertidor POD (diamino peroxidasa) por 30 minutos a 37°C, nuevamente al finalizar, se lavó con tris buffer y se reveló la reacción de TUNEL con diaminobenzidina por 5 minutos, formando un producto final permanente de color café. Posteriormente se lavaron las laminillas y se realizó una contrateñición con hematoxilina para su análisis al microscopio. La evaluación se realizó de igual manera que en el tratamiento inmunohistoquímico, revisándose 100 células por tratamiento, considerando aquellas teñidas de color café como positivas a apoptosis y de color morado a las negativas a apoptosis.

## **5.2 Toxicidad aguda**

Se utilizaron ratones de cepa Hsd:ICR con pesos entre 24-30 gramos y ratas de cepa Hsd:Wistar con pesos entre 170-200 gramos, todos los animales siendo jóvenes y en el caso de las hembras, nulíparas, provenientes del Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio. Dichos animales fueron alojados en la UNEXA bajo condiciones ambientales controladas que incluyeron extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora mediante filtros HEPA, los cuales filtran partículas hasta de 3 µm en el aire de inyección. La temperatura se mantuvo a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  y la humedad relativa en 55%, los ciclos de luz/oscuridad fueron de 12/12 horas. Se les proporcionó alimento Harlan Teklad 2018S para ratón/rata y agua *ad libitum* filtrada hasta 0.22 µm y clorada hasta 10 ppm. Cinco

ratones o ratas fueron alojados en jaulas de polisulfonato de 19 x 10.5 x 8 cm, o de 32 x 47 x 20 cm respectivamente, acondicionadas con cama Aspen Pine Shaving durante 3 días previos al tratamiento para su aclimatación, todo esto de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Dado que tanto Kikuzubam<sup>®</sup> como MabThera<sup>®</sup> se encuentran en presentaciones de 500 mg/50 mL y el volumen máximo que se puede administrar vía intravenosa en ratones es de 0.5 mL y de 1.5 mL en ratas (Diehl, 2001), se llevó a cabo la concentración necesaria de los productos por medio de un sistema de flujo tangencial (Centramate) en la Planta de Laboratorios de Probiomed, presuponiendo un peso promedio de 30 g para los ratones y 200 g para las ratas, posteriormente se realizaron los cálculos para determinar el volumen a administrar en cada una de las dosis.

El Kikuzubam<sup>®</sup> se probó a dosis de 470, 560, 650, 740 y 830 mg/kg en 5 machos y 5 hembras por dosis, aplicándose por vía intravenosa e intraperitoneal, siendo un total de 100 ratones. Adicionalmente, como testigo negativo, se aplicaron 0.4 mL del vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup> a 10 ratones, 5 machos y 5 hembras, únicamente por vía intravenosa y, otros 10 ratones sirvieron como testigo positivo, y se les administró 830 mg/kg de Mabthera<sup>®</sup>, dando un total de 120 ratones. En ratas se probaron las dosis de 380, 470, 560, 650, 740 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> en 5 machos y 5 hembras por dosis, aplicándose por vía intravenosa e intraperitoneal siendo un total de 100 ratas.

Todas las dosis mencionadas fueron únicas. Los animales fueron observados durante la aplicación de los medicamentos, constantemente durante las primeras 2 horas post-inoculación y al menos 5 veces al día durante los 14 días posteriores que duraron las observaciones. Todos los animales fueron pesados el día de la aplicación, así como al día 7 y al 14. Durante las observaciones se puso especial interés en los parámetros enlistados en el cuadro 1, posteriormente fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>.

El objetivo de este estudio era obtener las dos mayores dosis que no causaran muerte súbita o durante los 14 días siguientes al menos en la mitad de la población y así, utilizarlas como base para el estudio de toxicidad subcrónica.

Cuadro 1. Parámetros clínicos revisados diariamente durante 14 días, luego de la administración única con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y MabThera<sup>®</sup> por vía intravenosa e intraperitoneal en ratas y ratones de ambos sexos.

Ausencia de efectos	Tremores	Defecación
Salivación	Convulsiones	Micción
Incoordinación	Parálisis	Respiración
Actividad	Piloerección	Descarga nasal
Interacción social	Alopecia	Vocalizaciones
Postración	Descarga nasal	Muerte

### 5.3 Toxicidad subcrónica

Los animales fueron alojados en la UNEXA con las mismas características descritas en la sección de toxicidad aguda, tanto en el mantenimiento de animales como en la concentración del fármaco, con la diferencia de que en esta ocasión, se mantuvo a 6 ratones en una caja para ratas. Se utilizaron 48 ratones de cada sexo, dando un total de 96 individuos fueron divididos en 4 grupos de 12 individuos para cada sexo. Cada grupo fue inoculado semanalmente (previamente pesados individualmente) durante 3 meses por vía intravenosa en vena caudal con una dosis de 740 y 830 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup>, el vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup> y agua inyectable (Laboratorios Pisa) respectivamente. Un día antes de finalizar el estudio, cada grupo se dividió en 4 subgrupos de 3 individuos cada uno y fueron alojados en jaulas metabólicas con la finalidad de recoger la orina producida durante 20 horas, obteniéndose así, 4 “pools” de cada grupo, para un total de 32 muestras. Al término del estudio cada individuo se anestesió en una cámara de CO<sub>2</sub> y fue degollado a cero para obtener la mayor cantidad posible de sangre, la cual fue colectada en un “microtainer” estéril con heparina para poder realizar un hemograma y bioquímica sanguínea individual. Una vez recolectada la sangre, cada individuo fue sometido a una necropsia completa para su posterior estudio histopatológico. Todos estos estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

#### 5.3.1 Hematología

Se realizó un hemograma completo con el uso de un analizador hematológico modelo RK10-VS, de marca BC-2800 Vet el cual trabaja mediante el fundamento de impedancia.

Dicho hemograma constó de las mediciones de hematocrito, eritrocitos, hemoglobina, volumen globular medio (VGM), concentración globular media de hemoglobina (CGMH), plaquetas y cuenta total de leucocitos. El hematocrito se corroboró manualmente con ayuda de un lector de hematocrito luego de centrifugar un capilar a 14,000 rpm durante 5 minutos. El plasma de ese capilar fue utilizado para obtener la cantidad de sólidos totales a través de un refractómetro modelo ZRP-312, de marca Zeigen. También se elaboró un frotis sanguíneo de cada individuo, el cual fue fijado al aire y teñido con Wright durante 4 minutos, posteriormente se le añadió amortiguador durante 8 minutos más, luego se lavó con agua corriente, se secó y se realizó el montaje de la laminilla colocando un cubreobjetos con resina. Los frotis teñidos se revisaron al microscopio para apreciar características morfológicas celulares y realizar un conteo diferencial de leucocitos.

### **5.3.2 Bioquímica sanguínea**

La mayor cantidad de la sangre obtenida fue centrifugada a 3,000 rpm durante 10 minutos, se separó el plasma, se vació en tubos Eppendorf estériles y se congeló a -4°C hasta su utilización. Posteriormente se midió urea y creatinina para evaluar la función renal, alanina amino transferasa (ALT), gamma glutamil transferasa (GGT) y bilirrubinas totales para evaluar la función e integridad hepática, todas estas mediciones se realizaron en un espectrofotómetro modelo Junior, de marca Vital Scientific.

### **5.3.3 Urianálisis**

Veinte horas antes de su sacrificio, los ratones de cada grupo fueron separados aleatoriamente en 4 subgrupos de 3 individuos cada uno y alojados en una caja metabólica para obtener 2-3 mL de orina y poder realizar un examen físico donde se tomó en cuenta la densidad urinaria con ayuda de un refractómetro modelo ZRP-312, de marca Zeigen, el color y turbidez de la orina. Un examen químico con una tira reactiva Combur<sup>10</sup> Test que determina la cantidad de glucosa, proteínas, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno, hemoglobina y pH. Posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos, se obtuvo el sedimento a partir de una décima parte del centrifugado y se revisó al microscopio en

busca de células de epitelio urinario, leucocitos, eritrocitos, cilindros, cristales, bacterias, etc.

#### **5.3.4 Necropsia**

La necropsia se realizó inmediatamente después de la eutanasia y toma de muestra sanguínea. Todos los animales de prueba fueron sometidos a una necropsia completa, que incluyó una revisión externa en busca de heridas, o secreciones por algún orificio natural. Se hizo la incisión primaria por línea media, desde la unión de las ramas mandibulares hasta el ano, con el fin de revisar el tejido subcutáneo y proceder a la apertura de las cavidades. Se inspeccionaron metódicamente todos los órganos, los cuales se disecaron y pesaron; posteriormente se almacenaron en un frasco individual con formalina al 10% amortiguada durante 48 horas para su correcta fijación. En el caso de los huesos, éstos fueron descalcificados en una solución de ácido acético al 5% durante 3 días.

#### **5.3.5 Histopatología**

Una vez fijados los órganos en formol, se procesaron en un Histoquinet Leica (TP 1020), el cual aclara, impregna y parafina los tejidos al sumergirlos automáticamente en un periodo de 20 a 24 horas. La inclusión, se realizó en un incluidor marca Leica para posteriormente realizar cortes de 3  $\mu\text{m}$  utilizando un micrótomo Leica (RM 2125 RT). Los tejidos se llevaron al tren de tinción de rutina (Hematoxilina Eosina) y finalmente las laminillas fueron montadas con resina para su revisión bajo el microscopio óptico. Los órganos revisados microscópicamente se enlistan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Órganos colectados para su estudio histopatológico, de ratones machos y hembras tratados semanalmente, durante 90 días con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa.

Cerebro (3 niveles)	Nervio ciático	Médula espinal
Hipófisis	Adrenales	Páncreas
Glándula mamaria	Tiroides/paratiroides	Timo o región tímica
Glándula de Harder	Glándulas salivales	Testículos
Epidídimos	Próstata	Vesícula seminal
Ovarios y cuernos uterinos	Cuerpo uterino y cérvix	Vagina
Corazón	Aorta	Médula ósea (fémur)
Bazo	Cornetes nasales	Tráquea
Pulmón	Hueso (cornetes nasales)	Esófago
Estómago	Duodeno	Yeyuno
Íleon	Colon	Ciego
Recto	Hígado	Vesícula biliar
Riñones	Vejiga urinaria	Ojos
Linfonodos*	Músculo esquelético	Piel

\*Se extrajeron varios linfonodos, uno relacionado con la ruta de administración (inguinal) y uno de un lugar alejado (retrofaríngeo, cadena mesentérica, mandibular, etc).

## 5.4 Farmacocinética

La farmacocinética es la cuantificación de las concentraciones de un fármaco con respecto al tiempo en diferentes fluidos del organismo, con la finalidad de elucidar los procesos de administración, distribución, metabolismo y excreción (ADME) del mismo. Sin embargo, estos modelos se aplican preferentemente a farmoquímicos y no es posible extrapolarlos a anticuerpos. En el presente ensayo, como aproximación a una farmacocinética, se midieron concentraciones plasmáticas ( $\mu\text{g/mL}$ ) durante siete días, mediante un ensayo de ELISA de captura. No se debe perder de vista que el objetivo principal de este estudio fue comparar el comportamiento de Kikuzubam<sup>®</sup> y Mabthera<sup>®</sup> en los primeros días post-tratamiento.

Se emplearon tres grupos de 5 ratas HSD:Wistar adultos jóvenes de ambos sexos, con las mismas características fisiológicas, de alojamiento y alimentación anteriormente descritas. El primer grupo recibió una dosis de 740 mg/kg, por vía intravenosa de Kikuzubam<sup>®</sup>, el segundo, la misma dosis de Mabthera<sup>®</sup>, el tercer grupo recibió 0.5 mL del vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup>. Se tomó una muestra de todos los animales antes de dosificar, al término de

la dosificación y cada 24 horas durante 7 días. Los sueros se evaluaron mediante la prueba de ELISA de captura, para determinar los niveles de anticuerpos anti CD20. Para las mediciones de ELISA se emplearon placas de ELISA maxisorp (NUNC), cada placa se fijó con 50  $\mu$ L del primer anticuerpo (MCZ 2260:Rat-antiriuximab Serotec) a una concentración de 1  $\mu$ L/mL, se incubó en refrigeración a 4°C durante 24 h y se lavó 5 veces con 350  $\mu$ L de solución de lavado (Solución salina fisiológica + 0.5% Tween). Los sueros problema y una solución de 5  $\mu$ g de Mabthera<sup>®</sup> se diluyeron 1:100 en solución diluyente (PBS + 1% BSA + 10% SFB) y se depositaron 50  $\mu$ L en cada pozo. La placa se incubó en refrigeración a 4°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se lavó 5 veces con 350  $\mu$ L de solución de lavado. Posteriormente se adicionaron a cada pozo 50  $\mu$ L del conjugado diluido 1:6000 (MCA647P:anti-IgG humano marcado con peroxidasa, Serotec). Se incubó a 30°C durante 2 h y se lavó 5 veces con 350  $\mu$ L de solución de lavado. Finalmente se agregaron 100  $\mu$ L de TMB y la placa se incubó a 30°C durante 20 minutos, se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de parado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M) y se hizo la lectura a 450 nm en un lector de ELISA (Thermo Electron Corporation). La curva estándar se obtuvo usando las concentraciones de 10, 25, 50, 100, 200, 250 y 500  $\mu$ g/mL de Mabthera<sup>®</sup> (ver anexo) y su concentración en cada muestra se determinó con base en la curva estándar, multiplicándose por el factor de dilución (1:5). Este estudio se realizó en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

### **5.5 Análisis estadístico**

Para los estudios de farmacodinamia se realizó un análisis de regresiones no lineales comparando los parámetros del innovador con el biocomparable. En el estudio de toxicidad aguda en ratones se realizó un análisis estadístico del peso de los ratones mediante el modelo polinomial de mediciones repetidas (SPSS ver 16<sup>®</sup>), con la prueba de esfericidad de Mauchy, la cual, al resultar significativa (covarianzas desiguales) se utilizó la corrección Greenhouse-Geisser para obtener el estadístico de prueba F. En el caso de toxicidad aguda de ratas, el estudio estadístico se hizo con el modelo polinomial de mediciones repetidas con prueba de esfericidad de Mauchy, para igualdad de covarianzas y se utilizó la corrección  $\epsilon$  para los grados de libertad con el paquete SPSS ver 16<sup>®</sup> con un modelo

de tres factores: vía, sexo y dosis. En el estudio de toxicidad subcrónica, los hemogramas fueron analizados mediante la prueba de ANDEVA con un modelo lineal univariado en el programa SPSS ver 16<sup>®</sup>, comparando todos los grupos con el testigo por medio de la prueba de Dunnet. Para la bioquímica clínica se utilizó un análisis de varianza para un diseño con dos factores: sexo y dosis. Después de un primer análisis, se vio que el género no mostraba diferencias, por lo que se decidió trabajar con los datos completos sin tomar en cuenta esa variable para tener mejor estimación, de modo que los análisis de comparaciones múltiples se llevaron a cabo con la prueba de Tukey para las variables que resultaron significativas. Para los urianálisis únicamente se utilizó estadística descriptiva y medidas de dispersión. Los hallazgos de las necropsias e histopatológicos fueron reportados descriptivamente. El estudio de farmacocinética fue analizado por un método de mediciones repetidas para la determinación de rituximab en suero, utilizando un modelo polinomial de mediciones repetidas (SPSS ver 16<sup>®</sup>) con el día de muestreo como factor dentro de sujetos y tratamiento como factor entre sujetos. Los niveles de rituximab fueron linealizados antes de ejecutar el análisis con objeto de equilibrar las varianzas. Debido a que se trata de mediciones repetidas en los mismos individuos se realizó una prueba de esfericidad de Mauchy, que al no resultar significativa ( $p=0.87$ ), los resultados se obtuvieron del análisis sin tomar en cuenta esfericidad. En todos los casos, la hipótesis nula se rechazó al ser menor a 0.05.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Inhibición de crecimiento celular**

En el caso de las células Pfeiffer, no se observa una relación dosis-respuesta para ninguno de los dos fármacos utilizados (Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>), y ambos tienen un porcentaje medio de crecimiento alrededor del 70%, es decir, después de 24 horas de estar en contacto con el fármaco 70 células de cada cien siguen un metabolismo normal y siguen proliferando, el resto puede tener alteraciones en el metabolismo, en su proliferación o estar muertas. No se observa diferencia en el comportamiento de los dos fármacos. En linfocitos humanos aislados tampoco se encuentra una relación dosis-respuesta, sin embargo, el

porcentaje medio de crecimiento es del 90% para todas las dosis utilizadas. Igualmente, no se observa diferencia en el comportamiento de los dos fármacos sobre este cultivo (figura 1).

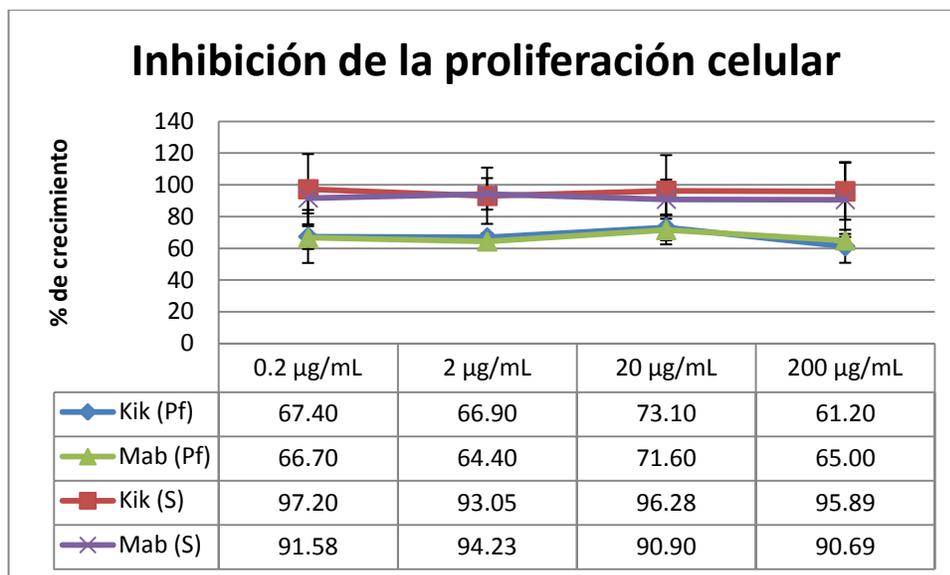


Figura 1. Porcentaje de proliferación de células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

\*Kik (Pf): Kikuzubam<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Mab (Pf): MabThera<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Kik (S): Kikuzubam<sup>®</sup> en linfocitos sanos, Mab (S): MabThera<sup>®</sup> en linfocitos sanos.

### 6.2 Expresión de moléculas Ki67, Bcl-2, Bax y caspasa 3

En ambos compuestos y cepas celulares, la expresión de las moléculas de proliferación celular (Ki67) y antiapoptosis (Bcl-2) presentaron una curva dosis-respuesta negativa, es decir, a concentraciones altas, la concentración de estos antígenos disminuyó. La expresión de las moléculas pro-apoptósicas (Bax y Caspasa 3), presentaron una curva directamente proporcional con el aumento de dosis, como se muestran en las gráficas 6-9. En todos los casos, ambos compuestos presentaron mayor efectividad contra las células Pfeiffer que contra los linfocitos sanos con mínimas diferencias entre ellos a ninguna de las dosis empleadas (figuras 2-5).

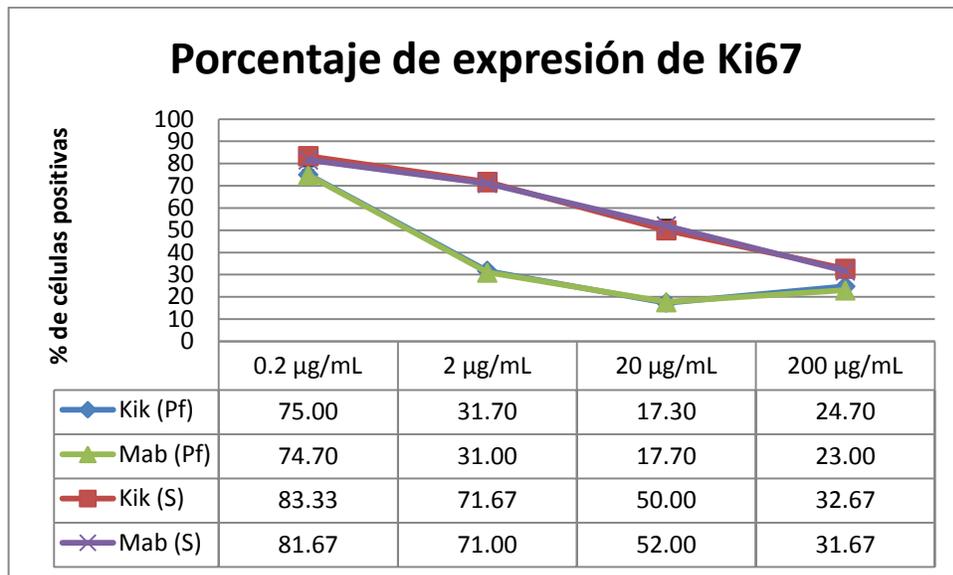


Figura 2. Porcentaje de expresión de Ki67 en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

\*Kik (Pf): Kikuzubam<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Mab (Pf): MabThera<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Kik (S): Kikuzubam<sup>®</sup> en linfocitos sanos, Mab (S): MabThera<sup>®</sup> en linfocitos sanos.

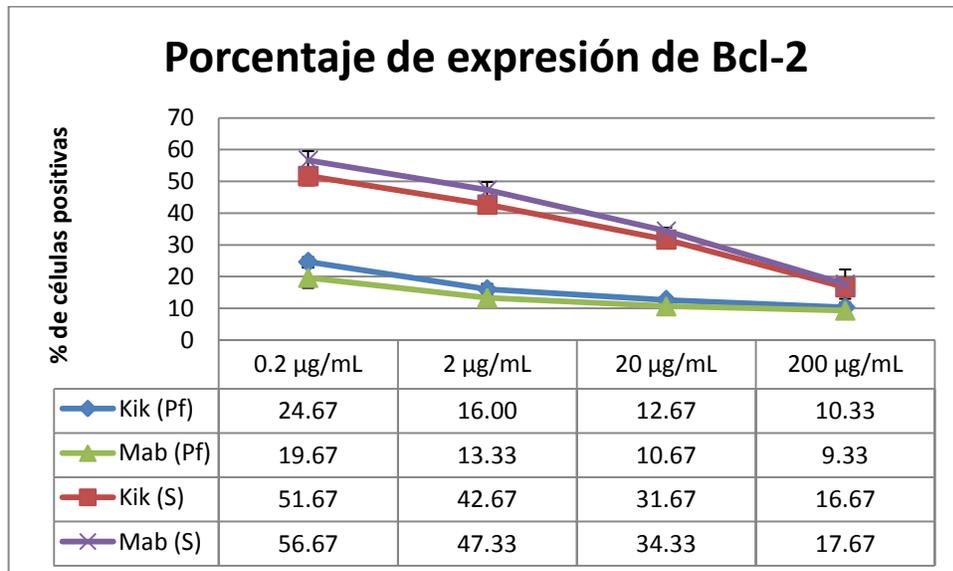


Figura 3. Porcentaje de expresión de Bcl-2 en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

\*Kik (Pf): Kikuzubam<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Mab (Pf): MabThera<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Kik (S): Kikuzubam<sup>®</sup> en linfocitos sanos, Mab (S): MabThera<sup>®</sup> en linfocitos sanos.

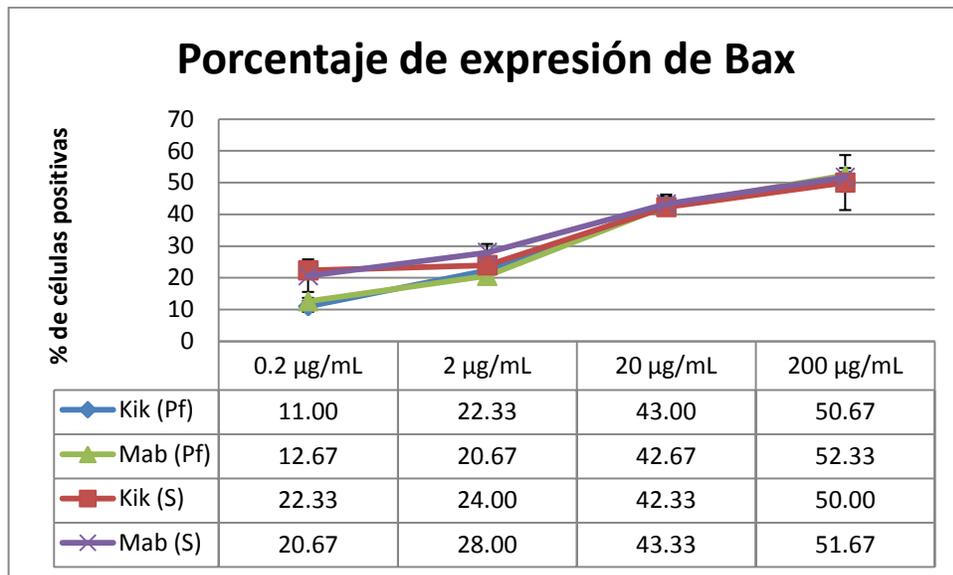


Figura 4. Porcentaje de expresión de Bax en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

\*Kik (Pf): Kikuzubam<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Mab (Pf): MabThera<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Kik (S): Kikuzubam<sup>®</sup> en linfocitos sanos, Mab (S): MabThera<sup>®</sup> en linfocitos sanos.

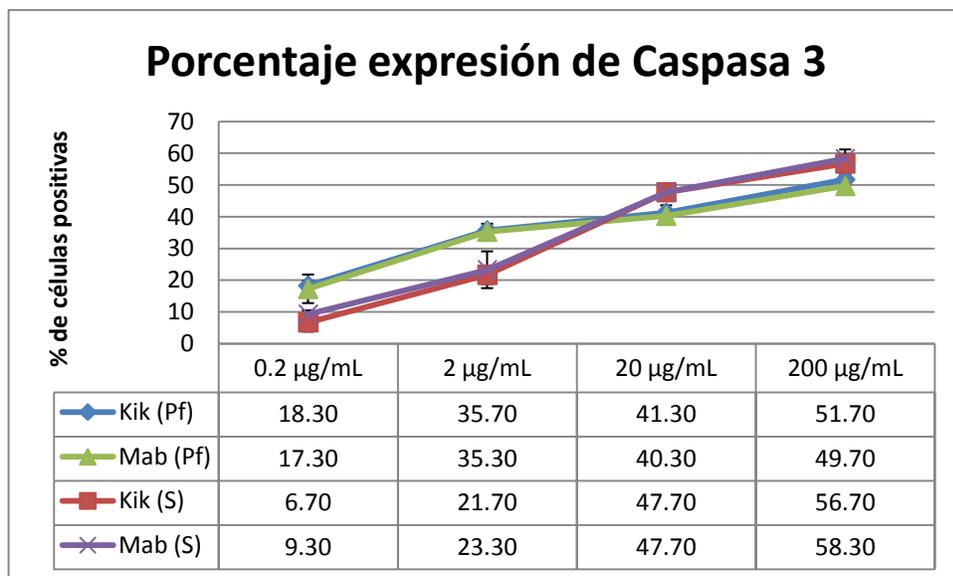


Figura 5. Porcentaje de expresión de Caspasa 3 en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

\*Kik (Pf): Kikuzubam<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Mab (Pf): MabThera<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Kik (S): Kikuzubam<sup>®</sup> en linfocitos sanos, Mab (S): MabThera<sup>®</sup> en linfocitos sanos.

### 6.3 Expresión de apoptosis

En las células Pfeiffer, la relación dosis-respuesta, presenta una relación lineal, es decir, el porcentaje de apoptosis sube proporcionalmente con la concentración de los fármacos, y no se encuentra ninguna diferencia entre la respuesta inducida por Kikuzubam<sup>®</sup> y por MabThera<sup>®</sup>. En el caso de los linfocitos humanos de sangre periférica, aunque la relación dosis-respuesta tiene un comportamiento no lineal, corresponde con la concentración de los fármacos. Tampoco existe diferencia entre la respuesta inducida por los diferentes fármacos (figura 6).

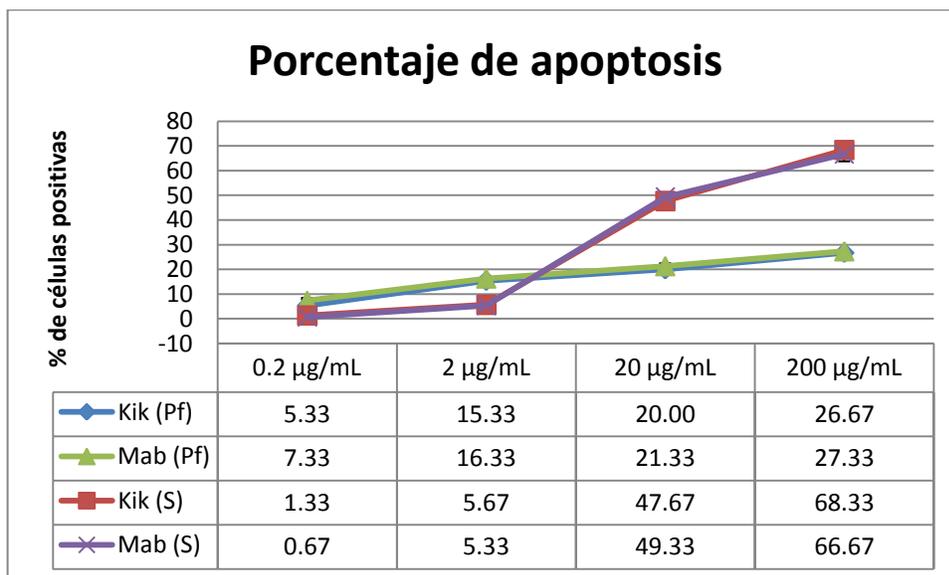


Figura 6. Porcentaje de apoptosis en células Pfeiffer y linfocitos humanos sanos luego de 24 horas de tratamiento con Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup>, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

\*Kik (Pf): Kikuzubam<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Mab (Pf): MabThera<sup>®</sup> en células Pfeiffer, Kik (S): Kikuzubam<sup>®</sup> en linfocitos sanos, Mab (S): MabThera<sup>®</sup> en linfocitos sanos.

## 6.4 Toxicidad aguda

Ningún animal presentó alteraciones fisiológicas o etológicas después de la administración de los diferentes compuestos y dosis, ni durante los siguientes 14 días de observación, todos subieron de peso paulatinamente y conforme a su edad, aunque el crecimiento en los grupos de administración intravenosa en ratones ( $p=0.001$ ) y ratas ( $p=0.003$ ) fue significativamente menor que en los grupos de vía intraperitoneal. Los machos crecieron con mayor rapidez que las hembras, encontrándose una diferencia de  $p=0.000$  en ambas especies. La dosis no presentó diferencias en el peso de los ratones ( $p=0.283$ ) ni en ratas ( $p=0.062$ ) (figuras 7-8).

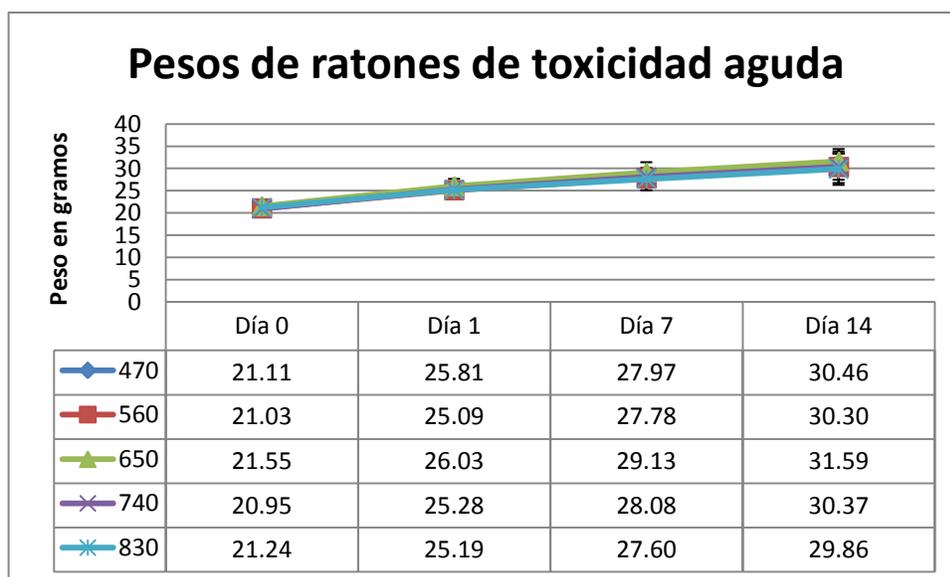


Figura 7. Peso de ratones de ambos sexos al día 0, 1, 7 y 14, luego de la administración única con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup> por vía intravenosa e intraperitoneal, siendo el día 0 el día que se recibieron los animales y el día 1 el día de la administración.

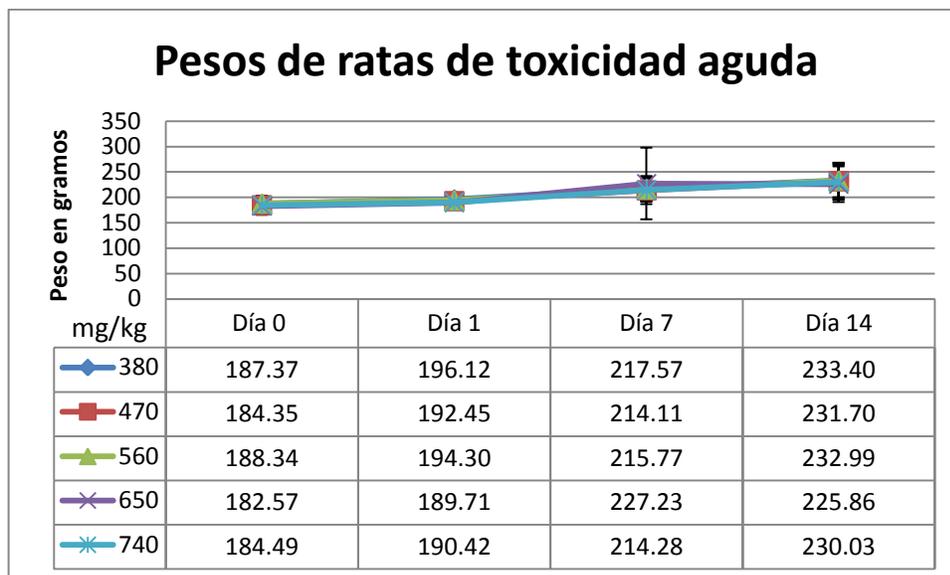


Figura 8. Peso de ratas de ambos sexos al día 0, 1, 7 y 14, luego de la administración única con diferentes dosis de Kikuzubam® y MabThera® por vía intravenosa e intraperitoneal, siendo el día 0 el día que se recibieron los animales y el día 1 el día de la administración.

## 6.5 Toxicidad subcrónica

### 6.5.1 Hematología

Varias muestras de sangre presentaron grado de hemólisis variable, escasa policromasia y anisocitosis, así como grados variables de agregados plaquetarios y coágulos ocasionales, es por eso que se decidió eliminar el conteo de plaquetas, ya que el analizador arrojaba datos no fidedignos (demasiado altos) debido a los coágulos y en el conteo manual no era posible cuantificarlas debido tanto a los coágulos como a los agregados plaquetarios. Los analitos con diferencias estadísticas significativas fueron la elevación del CGMH en el grupo de vehículo de Kikuzubam® de machos ( $p=0.045$ ), la disminución de sólidos totales en el grupo de 840 mg/kg de Kikuzubam® en hembras ( $p=0.000$ ) y la elevación de neutrófilos en el grupo de 740 mg/kg de Kikuzubam® en hembras ( $p=0.024$ ). Los resultados de las plaquetas fueron excluidos dada la gran cantidad de muestras con las características previamente mencionadas (cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de los hemogramas de ratones machos y hembras, realizados al final del tratamiento semanal con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

<b>Machos</b>	<b>Agua</b>	<b>Vehículo</b>	<b>740 mg/kg</b>	<b>830 mg/kg</b>
Hematocrito L/L	0.45 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.02
Hemoglobina g/L	147 $\pm$ 10	174 $\pm$ 17	162 $\pm$ 7	165 $\pm$ 10
Eritrocitos x10 <sup>12</sup> /L	9.0 $\pm$ 0.7	10.4 $\pm$ 0.9	10.0 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0.5
VGM fL	50 $\pm$ 3	49 $\pm$ 1	48 $\pm$ 2	49 $\pm$ 3
CGMH g/L	327 $\pm$ 10	344 $\pm$ 9*	338 $\pm$ 6	336 $\pm$ 7
Sólidos Tot. g/L	57 $\pm$ 4	57 $\pm$ 3	59 $\pm$ 5	56 $\pm$ 5
Leucocitos x10 <sup>9</sup> /L	12.1 $\pm$ 6.1	7.6 $\pm$ 5.3	7.8 $\pm$ 2.1	5.3 $\pm$ 2.2
Neutrófilos x10 <sup>9</sup> /L	6.6 $\pm$ 4.4	4.1 $\pm$ 3.8	4.3 $\pm$ 2.4	2.9 $\pm$ 1.3
Linfocitos x10 <sup>9</sup> /L	5.5 $\pm$ 2.4	2.8 $\pm$ 1.9	3.4 $\pm$ 1.8	2.4 $\pm$ 1.2
Monocitos x10 <sup>9</sup> /L	0.0 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Eosinófilos x10 <sup>9</sup> /L	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<b>Hembras</b>	<b>Agua</b>	<b>Vehículo</b>	<b>740 mg/kg</b>	<b>830 mg/kg</b>
Hematocrito L/L	0.49 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.02
Hemoglobina g/L	169 $\pm$ 11	165 $\pm$ 7	165 $\pm$ 8	166 $\pm$ 6
Eritrocitos x10 <sup>12</sup> /L	10.4 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0.6	10.2 $\pm$ 0.6
VGM fL	48 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2	48 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2
CGMH g/L	345 $\pm$ 7	344 $\pm$ 6	343 $\pm$ 8	342 $\pm$ 7
Sólidos Tot. g/L	65 $\pm$ 3	61 $\pm$ 3	61 $\pm$ 2	56 $\pm$ 3 *
Leucocitos x10 <sup>9</sup> /L	6.3 $\pm$ 4.0	7.0 $\pm$ 1.9	7.4 $\pm$ 3.0	7.4 $\pm$ 3.4
Neutrófilos x10 <sup>9</sup> /L	1.1 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 2.0*	1.2 $\pm$ 0.1
Linfocitos x10 <sup>9</sup> /L	5.0 $\pm$ 3.2	6.1 $\pm$ 1.9	4.3 $\pm$ 2.2	6.0 $\pm$ 3.4
Monocitos x10 <sup>9</sup> /L	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1
Eosinófilos x10 <sup>9</sup> /L	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1

\*Se marcan con un asterisco los analitos estadísticamente diferentes.

### 6.5.2 Bioquímica sanguínea

Los analitos que presentaron diferencias estadísticas significativas fueron la creatinina y GGT, siendo en ambos casos más altos ( $P=0.045$ ) para el grupo tratado con agua inyectable (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de las bioquímicas sanguíneas de ratones machos y hembras, realizadas al final del tratamiento semanal con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

Metabolito	Agua	Vehículo	740 mg/kg	830 mg/kg
Creatinina mmol/L	59.5 $\pm$ 2.7*	57.9 $\pm$ 2.6	54.4 $\pm$ 2.7	49.1 $\pm$ 2.7
Urea mmol/L	6.8 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.4
ALT U/I	47.3 $\pm$ 2.0	47.5 $\pm$ 1.9	47.0 $\pm$ 2.0	36.1 $\pm$ 1.9
GGT U/I	5.0 $\pm$ 0.7*	3.6 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 1.0	1.6 $\pm$ 0.6
Bilirrubina mmol/L	1.9 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.7

\*Se marcan con un asterisco los analitos estadísticamente diferentes.

### 6.5.3 Urianálisis

Las muestras de todos los grupos presentaron una ligera turbidez o apariencia translúcida, color amarillo y densidad de  $1.045 \pm 0.011$ . El pH de todos los grupos fue de  $5.81 \pm 0.37$ . En algunas muestras, la tira reactiva detectó trazas de proteínas, pero en ninguna detectó glucosa, cetonas, bilirrubina o hemoglobina. Microscópicamente, se encontraron escasas células de epitelio urinario bajo, ocasionalmente algunos leucocitos, así como abundante flora bacteriana, material granular (artefactos) y cristales de estruvita en la mayoría de las muestras sin distinción de grupos. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de los urianálisis de ratones machos y hembras, realizados al final tratamiento semanal con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, presentados con media  $\pm$  desviación estándar.

	<b>Agua</b>	<b>Vehículo</b>	<b>740 mg/kg</b>	<b>830 mg/kg</b>
Apariencia	Turbio 1+	Turbio 1+	Transparente	Turbio 1+
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Densidad	$1.0435 \pm 0.011$	$1.054 \pm 0.003$	$1.035 \pm 0.012$	$1.044 \pm 0.009$
pH	$5.75 \pm 0.00$	$5.50 \pm 0.00$	$6.00 \pm 0.00$	$6.12 \pm 0.18$
Proteínas g/L	$0.15 \pm 0.00$	$0.30 \pm 0.00$	$0 \pm 0.00$	$0.07 \pm 0.11$
Glucosa mmol/L	$0 \pm 0.00$	$0 \pm 0.00$	$0.15 \pm 0.21$	0.00
Cetonas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubinas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Eritrocitos	0	0 a 1	0	0
Leucocitos	0	0	0 a 1	0
C. renales	0	0	0	0
C. trasitorias	0	0	0	0
Escamas	0	0	0	0
Cilindros	0	0	0	0
Cristales	Estruvita 1+	0	0	0
Bacterias	Bacilos 1+	Cocos 1+	Cocos y bacilos 2+	Negativo
Lípidos	Negativo	1+	Negativo	Negativo
Artefactos	1+	1+	1+	1+

#### 6.5.4 Necropsia

Macroscópicamente no se encontraron alteraciones, con excepción del grupo testigo de machos, en el que la mayoría de los individuos presentó laceraciones cutáneas.

#### 6.5.5 Histopatología

Los cambios microscópicos observados en todos los cortes de los órganos revisados, fueron discretos e inespecíficos. Algunos de los individuos presentaron cierta despoblación linfocítica en bazo. El aparato que más cambios presentó fue el digestivo, siendo mayormente una hiperplasia del tejido linfocítico asociado a la mucosa. En el cuadro 6 se presentan las frecuencias de las alteraciones presentadas en cada grupo. Todas las alteraciones encontradas individualmente se presentan en los cuadros 12-15 en la sección de anexos.

Cuadro 6. Número de ratones machos y hembras tratados semanalmente con diferentes dosis de Kikuzubam<sup>®</sup>, su vehículo y agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días, que presentaron hallazgos histológicos en sus diferentes aparatos o sistemas.

<b>Alteraciones en machos</b>	<b>Agua</b>	<b>Vehículo</b>	<b>740 mg/kg</b>	<b>830 mg/kg</b>
Aparato respiratorio	0/12	1/12	3/12	1/12
Aparato digestivo	10/12	7/12	9/12	8/12
Sistema hematopoyético	7/12	6/12	6/12	6/12
Sistema urogenital	4/12	4/12	3/12	4/12
Sistema integumentario	6/12	4/12	2/12	6/12
SCPA	1/12	2/12	1/12	0/12
<b>Alteraciones en hembras</b>	<b>Agua</b>	<b>Vehículo</b>	<b>740 mg/kg</b>	<b>830 mg/kg</b>
Aparato respiratorio	1/12	3/12	1/12	2/12
Aparato digestivo	12/12	9/12	10/12	10/12
Sistema hematopoyético	6/12	6/12	3/12	2/12
Sistema urogenital	6/12	5/12	4/12	4/12
SCPA	0/12	0/12	2/12	0/12

\*SCPA: Sin cambios patológicos aparentes.

## 6.6 Farmacocinética

Existen diferencias significativas entre Kikuzubam<sup>®</sup> y Mabthera<sup>®</sup> ( $p=0.000$ ), ésta diferencia fue similar a través del tiempo medido ( $p=0.204$ ). Se observa una clara tendencia del grupo tratado con el biocomparable a mantener mayores niveles en plasma que el innovador durante los 7 días (figura 9).

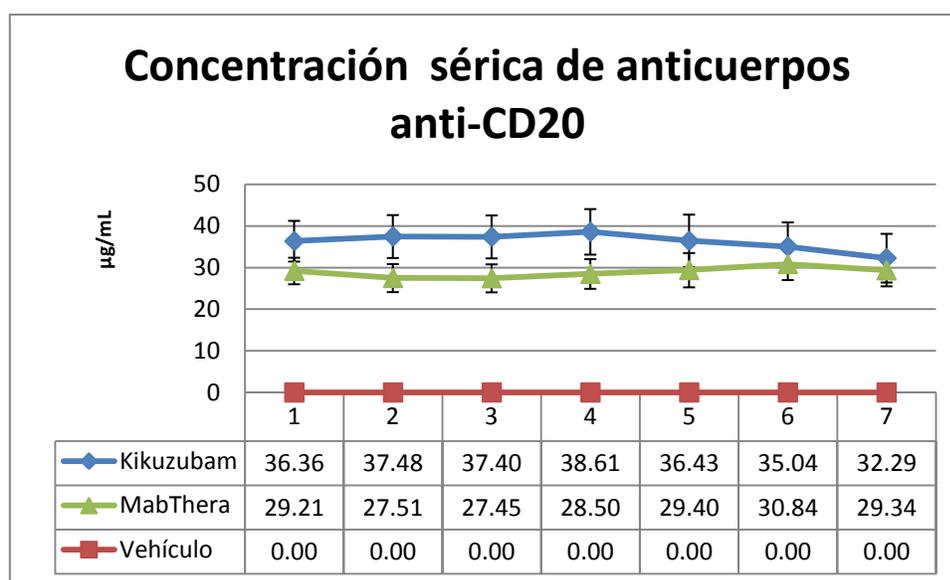


Figura 9. Medias marginales de anticuerpos anti-CD20 medidos diariamente en suero de ratas durante 7 días luego de administrar una dosis única de 740 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> y MabThera<sup>®</sup> y, 0.5 mL del vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup>.

## 7. DISCUSIÓN

Con la realización de esta serie de estudios se ha demostrado la eficacia y seguridad del biocomparable, así como su semejanza con el innovador tanto en la destrucción de linfocitos B *in vitro*, como en la seguridad que representa para el animal tratado *in vivo*.

Dado que el rituximab no se une a los linfocitos de ninguna especie animal, con excepción del humano y algunos primates (EMEA, 2010), en los hemogramas realizados, estas células se mantuvieron dentro de rangos, demostrando así, que el biocomparable no afectó a los linfocitos de estas especies, por otro lado, aunque en varios sujetos de prueba

los órganos linfoides (linfonodos y bazo) presentaron ligera despoblación, no hubo una tendencia hacia ningún grupo en particular, así como tampoco una atrofia severa en dichos órganos, lo cual nos confirma los resultados de los hemogramas, ya que si hubiéramos encontrado cualquiera de estos órganos hiperplásicos, podríamos pensar en una regeneración de estas células, más aún, esta despoblación linfoide es tan escasa y no hay evidencia de un componente inflamatorio, que no hay fundamentos para pensar en que hubo destrucción celular *in situ*. Dicho lo anterior, era de esperarse que la médula ósea no presentara alteración alguna en la línea de células mononucleares y, aunque con la técnica utilizada no podemos saber qué células son de la línea linfocítica, tampoco se encuentra una hipoplasia o hiperplasia de esta estirpe celular que nos haga pensar en una alteración en la producción de las mismas. Ningún tratamiento produjo alteraciones en las células sanguíneas u órganos hematopoyéticos y linfoides.

En el ensayo de la inhibición en la proliferación celular no se observa una relación dosis-respuesta para ninguno de los dos biofármacos utilizados en células Pfeiffer, pero tampoco se observan diferencias en el comportamiento de los dos biofármacos. En linfocitos de humanos sanos de sangre periférica tampoco se encuentra una relación dosis-respuesta, sin embargo el porcentaje medio de crecimiento es mayor que en las células Pfeiffer, tampoco se observa diferencia en el comportamiento con los dos biofármacos sobre este cultivo primario, de manera que podemos decir que aunque no se detuvo la proliferación celular, ambos compuestos producen la misma respuesta, es decir, son similares, siendo la proliferación mayor en cultivos sanos posiblemente debido a que se proliferaron leucocitos sin distinción, siendo estas una mezcla de diferentes estirpes y no únicamente de linfocitos B, que son las células que presentan CD20 en su membrana (Jubala, 2005). Para la expresión de apoptosis de linfocitos sanos, la relación dosis-respuesta tiene un comportamiento no lineal, no obstante, no hay diferencia entre la respuesta inducida por los biofármacos en ninguna cepa. Con respecto al antígeno de proliferación celular Ki67, hay una relación inversamente proporcional a la dosis, es decir, a concentraciones altas la expresión del antígeno Ki67 disminuye, tampoco existe diferencia entre el comportamiento de ambos biofármacos en ambas cepas, lo que concuerda con los resultados del

experimento de inducción de apoptosis, ya que a dosis altas se encuentra un porcentaje de apoptosis mayor y una proliferación celular menor. En la expresión de las proteínas Bcl-2 (proteína anti-apoptótica), Caspasa 3 y Bax (proteínas pro-apoptóticas), se obtienen resultados igualmente en una relación dosis-respuesta en los 2 compuestos y las 2 cepas. Mientras las proteínas pro-apoptóticas aumentan (Caspasa 3 y Bax), la proteína anti-apoptótica (Bcl-2) disminuye, lo que concuerda con los resultados obtenidos para el antígeno de proliferación celular (Ki67) y los obtenidos en la determinación de apoptosis por la reacción de TUNEL. Por lo tanto, no se encontraron diferencias entre el comportamiento de los biofármacos a ninguna de las dosis empleadas.

El aumento de creatinina del grupo testigo pudiera asociarse a una mayor masa muscular (Thrall, 2004) en este grupo, sin embargo, los pesos de todos los sujetos de prueba fueron en aumento conforme a la edad, histológicamente, algunos riñones, presentaron ligero infiltrado linfoplasmocítico en su intersticio o pelvícula, infortunadamente no se pudo correlacionar a una infección renal *in vivo* con los urianálisis debido al método de colección de la muestra que no fue posible realizar asépticamente, aunque sí podemos pensar en la ausencia de dicha infección al no encontrar leucocitos en los sedimentos urinarios. El riñón es un órgano a tomar en cuenta en este estudio sobre todo por la farmacocinética de las proteínas, como es el anticuerpo (IgG) utilizado (Maloney, 1997), que al no unirse a ninguna célula de esta especie, podría haber resultado en depósitos proteicos en los túbulos renales, lesión que no se presentó en ninguno de los animales tratados en los diferentes grupos. Debemos resaltar que los resultados obtenidos en cada uno de los “pools” de orina no muestran ninguna alteración fuera de las relacionadas con la toma de muestra, tales como ligera bacteriuria y cristaluria producida *in vitro*, las densidades urinarias, determinación más importante para correlacionar con la función renal (Graff, 1987), se encuentran por encima de 1.030, lo cual nos descarta el daño renal (Kosinchsuk, 2004), aún después de ser colectada la orina constantemente durante 12 horas, situación que la disminuye (Graff, 1987). Aunque la GGT está aumentada en este grupo testigo, los grupos tratados con el compuesto no presentaron elevación alguna, por lo tanto no podemos pensar que se trata de un daño hepático ya que este analito que carece de relevancia al encontrarse

disminuido (Thrall, 2004), esto aunado a la ausencia de ictericia en los animales y sus plasmas, así como la escasa cantidad de hígados que presentaron ligera degeneración o necrosis, pues debemos recordar que este órgano es capaz de mantener su funcionamiento aún cuando su integridad física esté disminuida hasta un 80%, aún cuando las camas suaves de madera, tales como las de aserrín de pino o cedro, idealmente no deben utilizarse para mantener ratones de laboratorio, dado que producen hidrocarburos aromáticos que inducen enzimas microsomales hepáticas (Hrapkiewicz, 1998). Después de este análisis, no podemos decir que haya alguna diferencia entre los compuestos o dosis utilizados, así como que cualquiera de ellos haya causado un daño severo al hígado o riñón, sin mencionar que las dosis utilizadas y la duración del tratamiento fueron ampliamente mayores a las utilizadas en medicina humana (McLaghlin, 1998).

Con el estudio de toxicidad aguda se demostró la ausencia de efectos clínico-tóxicos en todos los sujetos de prueba en un periodo de 14 días, así como la ganancia de pesos a las diferentes dosis empleadas en ambas especies. Por otro lado, la menor ganancia de peso para los grupos inoculados por vía intravenosa, se puede asociar al mayor estrés producido por el manejo mismo de la administración. La diferencia de peso entre sexos es normal, dado que los machos de las especies empleadas tienden a crecer más y más rápido que las hembras. Debemos resaltar que no existe ninguna diferencia en la ganancia de pesos entre los compuestos utilizados, pudiendo concluir que ninguno de los dos biofármacos interviene con el crecimiento normal de estas especies, ni produce alteración física o etológica luego de la aplicación de una dosis alta.

El CGMH del vehículo del biocomparable de machos es estadísticamente diferente debido posiblemente al artefacto de hemólisis (Meyer, 2000) presentado en la mayoría de las muestras, los neutrófilos del grupo de 740 mg/kg del biocomparable en hembras están ligeramente más altos que en los demás grupos, infortunadamente, los valores de referencia del laboratorio Harlan, son diferentes a nuestros resultados, debido posiblemente a las diferencias climatológicas de la ciudad de México que no pueden ser controladas, tales como la altitud. En el grupo de hembras con 830 mg/kg del biocomparable, las concentraciones de sólidos totales fueron menores comparadas con los demás grupos;

dentro de las causas más comunes encontramos la disminución en su síntesis hepática, o falta en su aporte (Stockham, 2008; Thrall, 2004), situaciones que se descartan, ya que en ninguna de las pruebas hepáticas o histológicas encontramos indicios de daño hepático, y todos los animales comieron el mismo alimento, además, todos fueron pesados semanalmente y ninguno dejó de ganar peso en su desarrollo o lo perdió una vez alcanzada la edad adulta.

Las lesiones encontradas en los machos del grupo testigo, pueden relacionarse con la territorialidad y dominancia de la especie, aunque es difícil justificar por qué fue el único grupo que presentó dicho comportamiento, ya que todos se mantuvieron bajo las mismas condiciones y los demás grupos de machos presentaron escasas muestras de agresividad entre ellos.

Histológicamente, las lesiones más frecuentes fueron ligeras, inespecíficas y no muestran un patrón hacia ninguno de los grupos tratados. Los hallazgos más comunes fueron ligera hiperplasia del tejido linfoide en intestinos y pulmones, órganos que están indirectamente conectados con el exterior y son las primeras líneas de defensa contra agentes externos, es decir, estos hallazgos no implican que haya enfermedad. Algunos de los bazo se encontraron con ligera atrofia linfoide, misma que al correlacionar con los hemogramas no presenta mayor relevancia. Las infecciones o fibrosis encontradas en glándula salival o de Harder, pueden asociarse a un traumatismo sufrido esporádicamente en algunos individuos y no representa mayor relevancia para este estudio.

Es necesario recordar que el rituximab no se une al CD20 de roedores y, por lo tanto no se espera una disminución en la concentración sérica excepto por la degradación inespecífica de proteasas, que para el caso de las IgG es de aproximadamente 30 días, esto significa que en la primer semana post-inoculación no tenía que haber disminuciones importantes en la concentración sérica de este anticuerpo. Es por esto que los resultados de este estudio no se presentan como parámetros farmacocinéticos (ABC, Tmax, t1/2, Cp, etc) sino como concentraciones linealizadas medias con respecto al tiempo. También se debe aclarar que se utilizaron productos concentrados por medio de un sistema de flujo

tangencial (Centramate<sup>®</sup>) y que las concentraciones así obtenidas pueden variar ligeramente, debido a que el método de cuantificación fuera diferente al empleado o a que el estándar no haya sido el innovador. En este estudio para evaluar las concentraciones, se calculó una curva estándar que fue realizada a partir del innovador y con base en los estudios previamente descritos, podemos afirmar que los niveles séricos no influyen en la actividad biológica de ninguno de los biofármacos.

## **8. CONCLUSIONES**

Después de analizar conjuntamente los resultados de todas las pruebas realizadas, no se encuentra evidencia científica que demuestre alguna diferencia en la acción, toxicidad y actividad biológica entre ambos biotecnológicos, siendo ambos eficaces para producir apoptosis en linfocitos B maduros, sus niveles son constantes en sangre durante 7 días, sin producir ningún tipo de toxicidad hacia órganos y tejidos en un periodo de 90 días, demostrando así que son biocomparables.

## 9. ANEXOS

Cuadro 7. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con 740 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> por vía intravenosa durante 90 días.

Grupos tratados con 740 mg/kg de Kikuzubam <sup>®</sup>	
Machos	Hembras
Ratón 1. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a bronquiolos. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Gliosis ligera. Hematopoyesis extramedular moderada. Nefritis intersticial linfocítica ligera. Dilatación ligera de vesícula seminal.	Ratón 1. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Pielonefritis linfocítica ligera.
Ratón 2. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a bronquiolos.	Ratón 2. Enteritis linfocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera.
Ratón 3. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Hematopoyesis extramedular ligera.	Ratón 3. Enteritis linfocítica ligera. Degeneración y necrosis focal hepática ligeras. Salpingitis supurativa ligera.
Ratón 4. Enteritis linfoplasmocítica ligera.	Ratón 4. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera.
Ratón 5. Neumonía linfocítica focal perivascular ligera. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Hematopoyesis extramedular ligera.	Ratón 5. Degeneración hepática moderada. Despoblación linfoide esplénica ligera.
Ratón 6. Despoblación linfoide esplénica ligera.	Ratón 6. SCPA
Ratón 7. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide esplénica ligera. Necrosis tubular renal ligera. Fibrosis dérmica difusa ligera.	Ratón 7. Hepatitis linfocítica ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Enteritis linfocítica ligera. Pielonefritis linfocítica ligera.
Ratón 8. Hepatitis linfoplasmocítica perivascular ligera. Enteritis linfocítica ligera. Nefritis linfocítica ligera. Dermatitis linfocítica zonal moderada, degeneración difusa dérmica grave, fibrosis dérmica difusa ligera, necrosis focal dérmica ligera.	Ratón 8. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Hepatitis linfocítica ligera.
Ratón 9. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso.	Ratón 9. SCPA
Ratón 10. SCPA	Ratón 10. Traqueítis linfocítica ligera. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso.
Ratón 11. Necrosis focal ligera en glándula salival. Despoblación linfoide esplénica ligera.	Ratón 11. Enteritis linfocítica ligera. Endometritis supurativa moderada.
Ratón 12. Enteritis linfocítica grave.	Ratón 12. Enteritis linfoplasmocítica ligera.

Cuadro 8. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con 830 mg/kg de Kikuzubam<sup>®</sup> por vía intravenosa durante 90 días.

Grupos tratados con 830 mg/kg de Kikuzubam <sup>®</sup>	
Machos	Hembras
Ratón 13. Neumonía histiocítica ligera. Degeneración cardiaca focal ligera. Reactividad linfonodular. Hematopoyesis extramedular ligera.	Ratón 13. Glositis mastocítica focal ligera. Enteritis linfocítica moderada. Hepatitis linfocítica focal ligera.
Ratón 14. Despoblación linfoide esplénica ligera, edema subcapsular esplénico ligero. Úlcera con costra epidermal, degeneración colágena ligera en dermis.	Ratón 14. Enteritis linfocítica ligera. Necrosis hepática focal ligera. Salpingitis linfocítica moderada.
Ratón 15. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Hematopoyesis extramedular grave. Despoblación linfoide esplénica ligera.	Ratón 15. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Dilatación y degeneración ligeras de G. de Harder. Cistitis linfocítica ligera.
Ratón 16. Linfadenitis granulomatosa moderada, linfadenitis mastocítica ligera. Pielonefritis linfocítica ligera.	Ratón 16. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Nefritis linfocítica focal perivascular ligera.
Ratón 17. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Úlcera sin costra epidermal, atrofia folicular ligera, dermatitis linfocítica ligera, fibrosis dérmica multifocal ligera.	Ratón 17. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Degeneración hepática moderada.
Ratón 18. Úlcera con costra epidermal, fibrosis dérmica difusa moderada, necrosis dérmica ligera.	Ratón 18. Fibrosis zonal en G. de Harder.
Ratón 19. Enteritis linfocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Fibrosis dérmica multifocal ligera.	Ratón 19. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso.
Ratón 20. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso.	Ratón 20. Enteritis linfocítica moderada. Quistes dérmicos.
Ratón 21. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Glomerulitis linfocítica ligera, hipertrofia de epitelio capsular ligera. Infiltrado linfocítico severo en vesícula seminal.	Ratón 21. Hematopoyesis extramedular ligera. Pielonefritis linfocítica ligera.
Ratón 22. Enteritis linfoplasmocítica moderada. Dermatitis supurativa focal ligera, fibrosis focal dérmica ligera.	Ratón 22. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso y necrosis ligera del mismo.
Ratón 23. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Pielonefritis linfoplasmocítica focal ligera. Fibrosis dérmica focal ligera, atrofia folicular ligera.	Ratón 23. Neumonía linfoplasmogranulomatosa ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso.
Ratón 24. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide esplénica moderada. Pielonefritis linfocítica moderada.	Ratón 24. Traqueítis linfoplasmocítica ligera. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a bronquiolos. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Degeneración hepática focal ligera. Despoblación linfoide linfonodular moderada.

Cuadro 9. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con el vehículo de Kikuzubam<sup>®</sup> por vía intravenosa durante 90 días.

Grupos tratados con vehículo de Kikuzubam <sup>®</sup>	
Machos	Hembras
Ratón 25. SCPA	Ratón 25. Enteritis linfocítica ligera.
Ratón 26. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide esplénica ligera. Pielonefritis linfoplasmocítica ligera.	Ratón 26. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Degeneración hepática focal ligera. Despoblación linfoide esplénica moderada. Salpingitis linfocítica ligera, edema uterino ligero.
Ratón 27. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso y enteritis linfoplasmocítica ligera. Hepatitis linfocítica ligera. Despoblación linfoide focal linfonodular ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera.	Ratón 27. Despoblación linfoide esplénica ligera.
Ratón 28. SCPA	Ratón 28. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Salpingitis linfocítica ligera. Degeneración tubular renal ligera. Fibrosis multifocal ligera en G. de Harder.
Ratón 29. Gastritis linfocítica ligera. Hepatitis linfocítica perivascular moderada. Degeneración, necrosis y calcificación muscular zonal ligera. Despoblación linfoide esplénica moderada. Mineralización ligera de conductos testiculares. Dermatitis supurativa ligera	Ratón 29. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Degeneración hepática ligera
Ratón 30. Hiperplasia de tejido linfoide asociado a bronquiolos. Hepatitis linfoplasmocítica multifocal ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Pielonefritis linfoplasmocítica ligera.	Ratón 30. Carcinoma bronquiolar. Degeneración hepática ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Degeneración moderada e infiltrado supurativo severo en G. de Harder.
Ratón 31. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a intestino grueso.	Ratón 31. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Infiltrado linfocítica periocular ligero. Despoblación linfoide esplénica ligera. Edema uterino ligero.
Ratón 32. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide esplénica moderada. Fibrosis dérmica moderada	Ratón 32. Pielonefritis linfocítica ligera. Dilatación moderada e infiltrado supurativo en G. de Harder.
Ratón 33. Pielonefritis linfocítica ligera.	Ratón 33. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso.
Ratón 34. Despoblación linfoide esplénica ligera. Fibrosis dérmica difusa moderada. Hiperplasia epidermal ligera.	Ratón 34. Neumonía peribronquiolar linfocítica ligera. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a

	intestino grueso y edema ligero en intestino grueso. Hepatitis linfocítica perivascular focal moderada. Despoblación linfoide esplénica ligera. Pielonefritis linfocítica moderada.
Ratón 35. Dermatitis supurativa ligera, fibrosis dérmica moderada. Infiltrado neutrofílico y fibrosis ligera en G. de Harder.	Ratón 35. Hepatitis linfocítica focal ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso.
Ratón 36. Edema ligero en intestino delgado. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso.	Ratón 36. Enteritis linfoplasmocítica moderada. Hiperplasia epidermal ligera. Infiltrado linfocítico ligero en G. de Harder.

Cuadro 10. Lesiones histológicas encontradas individualmente en ratones de ambos sexos tratados semanalmente con agua inyectable por vía intravenosa durante 90 días.

Grupos tratados con agua inyectable	
Machos	Hembras
Ratón 37. Degeneración y necrosis hepática ligera. Degeneración renal moderada. Infiltrado linfocítico ligero en lagrimal. Úlcera con costra, fibrosis ligera epidermal.	Ratón 37. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso, enteritis linfocítica ligera. Hepatitis linfocítica perivascular ligera. Despoblación linfoide esplénica focal severa. Pielonefritis linfoplasmoicítica moderada.
Ratón 38. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide linfonodular ligera. Despoblación linfoide esplénica moderada. Pielonefritis linfocítica ligera.	Ratón 38. Glositis mastoeosinofílica y edema lingual ligeros. Enteritis linfocítica ligera. Degeneración hepática ligera. Despoblación linfoide esplénica moderada. Salpingitis supurativa ligera.
Ratón 39. Degeneración y necrosis hepática ligera. Despoblación linfoide esplénica moderada. Degeneración renal moderada.	Ratón 39. Glositis mastoeosinofílica y edema lingual ligeros. Enteritis linfoplasmocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera.
Ratón 40. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Hematoma grave en muslo derecho. Despoblación linfoide linfonodular ligera.	Ratón 40. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Colangitis linfocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Salpingitis supurativa ligera.
Ratón 41. Enteritis linfocítica ligera. Úlcera con costra epidermal, fibrosis multifocal coalescente y atrofia folicular ligeras.	Ratón 41. Degeneración hepática focal ligera. Despoblación linfoide linfonodular moderada. Infiltrado linfocítico, degeneración multifocal y fibrosis moderadas en G. de Harder.
Ratón 42. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Fibrosis zonal ligera en G. de Harder. Úlcera sin costra, fibrosis multifocal y atrofia folicular ligeras.	Ratón 42. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Edema uterino focal moderado.
Ratón 43. SCPA.	Ratón 43. Hepatitis linfoplasmocítica multifocal periportal ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Nefritis periglomerular linfoplasmocítica moderada. Dilatación de conductos de G. sebáceas epidérmicas. Infiltrado linfosupurativo multifocal ligero en G. de Harder.
Ratón 44. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide esplénica moderada. Necrosis testicular focal ligera. Fibrosis dérmica moderada difusa.	Ratón 44. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Sialoadenitis linfocítica multifocal ligera. Despoblación linfoide esplénica ligera. Nefritis linfocítica perivascular ligera. Infiltrado linfocítico ligero en G. de Harder.

Ratón 45. Enteritis linfocítica ligera. Despoblación linfoide esplénica moderada. Úlcera con tejido de granulación, fibrosis y atrofia folicular ligeras.	Ratón 45. Hiperplasia moderada de tejido linfoide asociado a bronquiolos. Enteritis linfocítica ligera.
Ratón 46. Despoblación linfoide esplénica ligera.	Ratón 46. Sialoadenitis linfocítica focal moderada.
Ratón 47. Enteritis linfocítica ligera. Hiperplasia severa de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Despoblación linfoide esplénica ligera. Hiperqueratosis moderada, hiperplasia epidermal ligera, fibrosis difusa moderada y atrofia folicular ligera.	Ratón 47. Enteritis linfocítica moderada, atrofia moderada de vellosidades. Hiperplasia ligera de tejido linfoide asociado a intestino grueso. Hepatitis linfocítica multifocal ligera. Infiltrado linfocítico en grasa pericárdica.
Ratón 48. Enteritis linfoplasmocítica moderada. Despoblación linfoide esplénica ligera. Infiltrado linfocítico ligero en G. de Harder. Úlcera sin costra, hiperqueratosis zonal ligera, hiperplasia epidermal ligera, atrofia folicular ligera y fibrosis difusa moderada.	Ratón 48. Enteritis linfoplasmocítica ligera.

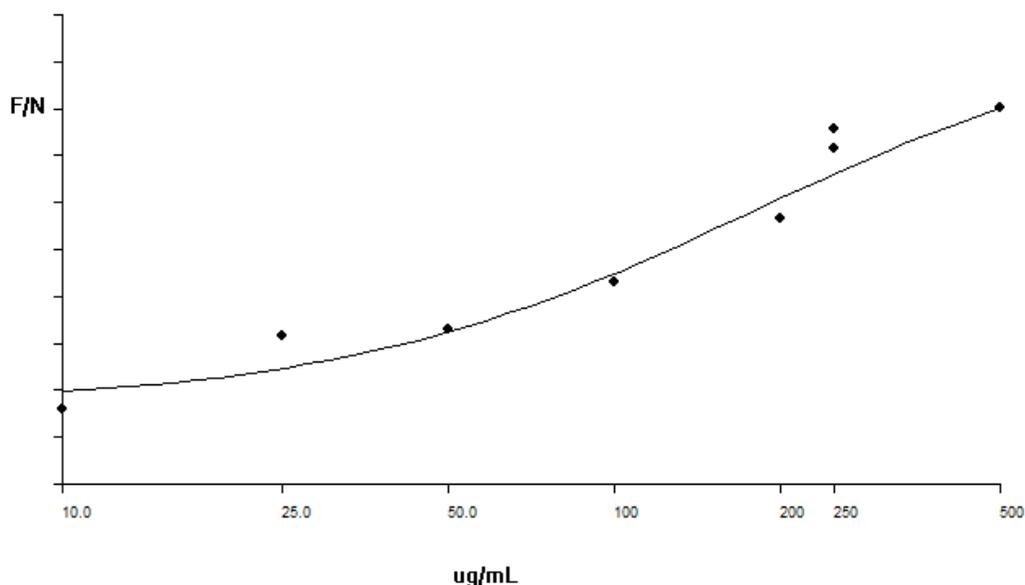


Figura 10. Curva estándar obtenida para determinar la concentración de anticuerpos anti-CD20 en suero de ratas.

## 10. REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Lee HN, et al ed., WHO Clasification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *WHO Press*. Francia, 2008.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lion. IARC Press, 2001.
3. Farreras P, Rozman C. Medicina Interna Volumen II. *Elsevier*, 14<sup>a</sup> ed., España, 2000.
4. Badin F, Hayslip J. Rituximab in the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma, focus on outcomes and comparative effectiveness. *ClinicoEconomics and Outcomes Research* 2010;2:37-45.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Non-Hodgkin Lymphoma Rates by Race and Ethnicity. Disponible en: <http://www.cdc.gov/cancer/hematologic/lymphoma/statistics/race.htm>
6. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a Standard Regimen (CHOP) With Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced non-Hodgkin`s Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;328(14)1002-1006.
7. Mihailović J, Tomislav P. Radioimmunotherapy: A Novel Treatment of non-Hodgkin Lymphoma. *Arch Oncol*. 2010;18(1-2)23-9.
8. Aguillón JC, Contreras J, Dotte A, Cruzat A, Catalán D, Salazar L, et al. Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1445-53.
9. Maloney DG. Preclinical and phase I and II trial of Rituximab. *Semin Oncol* 1999;5:74-78.
10. Wilson WH. Chemotherapy sensitization by Rituximab: Experimental and clinical evidence. *Semin Oncol*2000;6:30-36.
11. Boye J, Elter T, Engert A. An Overview of the Current Clinical Use of the Anti-CD20 Monoclonal Antibody Rituximab. *Annals of Oncology* 2003;14:520-35.

12. Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: Mechanism of Action and Resistance. *Semin Oncol.* 2002;29(2):2-9.
13. Goldsmith SJ, Radioimmunotherapy of Lymphoma: Bexxar and Zevalin. *Semin Nucl.* 2010;40:122-135.
14. Press OW. Prospects for the Management of non-Hodgkin's Lymphomas with Monoclonal Antibodies and Immunoconjugates. *Cancer JSci Am.* 1998;4(2):19-26.
15. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, et al. Expression of Human B cell Associated Antigens on Leukemias and Lymphomas: A Model of Human B cell Differentiation. *Blood.* 1984;63:1424-1423.
16. Press OW. Radiolabelled Antibody Theraoy of B-cell Lymphomas. *Semin Oncol.* 1999;26(14):58-65.
17. White CA, Weaver R, Royston I. Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy for non-Hodgkin's Lymphoma. *Minerva Biotechnol.* 1998;10:108-117.
18. Weiner GJ. Rituximab: mechanism of action. *Seminars in Hematology.* 2010;47(2):115-123
19. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of Malignant Human B Cells by Ligation of CD20 With Monoclonal Antibodies. *Blood* 1998; 91:1644-52.
20. Mathers S, Rickers A, Bommert K. Anti CD20 and B-cell receptor-mediated apoptosis: Evidence for shared intracellular signaling pathways. *Cancer Res* 2000;20:2961-2966.
21. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells *in vivo* by a Chimeric Mouse Human Monoconal Antibody to CD20. *Blood.* 1994;83:435-445.
22. Flieger D, Renoth S, Beier I, et al. Mechanism of Cytotoxicity Induced by Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody IDEC-C2B8 in CD20-Expressing Lymphoma Cell Lines. *Cell Immunol.* 2000;204:55-63
23. Onrust SV, Lamb HM, Balfour JA. Rituximab. *Drugs* 1999;1:79-88.
24. Maloney DG, Smith B, Appelbaum FR. The antitumor effect of monoclonal anti-CD20 (mAb) therapy includes direct anti-proliferative activity and induction of

- apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Blood* 1996;88:637a.
25. Demidem A, Lam T, Alas S, et al. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) Monoclonal Antibody Sensitizes a B Cell Lymphoma Cell Line to Cell Killing by Cytotoxic Drugs. *Cancer Biother Radiopharm.* 1997;12(3):177-186.
  26. Alas S, Bonavida B, Emmanouilides C. Potentiation of Fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifylline and Rituximab. *Anticancer Res* 2000;20:2961-2966.
  27. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000;95:3900-3908.
  28. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukaemia: Relationship to in vivo Rituximab resistance. *J Clin Oncol* 2003;21:1466-1471.
  29. Kosits C, Callaghan M. Rituximab: A new monoclonal antibody therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol Nurs Forum.* 2000;27;151-159.
  30. Forero A, LoBuglio AF, History of Antibody Therapy for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Semin Oncol.* 2003;30(17):1-5.
  31. Flowers CR, Armitage JO. A Decade of Progress in Lymphoma: Advances and Continuing Challenges. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia.* 2010;10(6):414-423.
  32. Leandro MJ, Edwards JCW, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 2001; 6: 883-8.
  33. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 2006;54:1390-400.

34. Pettengell R, Linch D. Position Paper on the Therapeutic use of Rituximab in CD20-Positive Diffuse Large B-cell non-Hodgkin`s Lymphoma. *Br J Haematol.* 2003;121(1)44-48.
35. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of Combined CHOP Plus Rituximab Therapy Dramatically Improved Outcome of Diffuse Large B-cell Lymphoma in British Columbia, *J Clin Oncol.* 2005;23(22):5027-5033.
36. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, Livingstone AM, Friedberg JW, Young F. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: Supportfor a “vaccinal effect” of Rituximab. *Blood* 2009;113:3809-3812.
37. Ley General de Salud, México, 2010.
38. NOM-073-SSA1-2005.
39. Coronel, MR. Listas, reglas para biocomparables. *El Economista*, lunes 12 de abril de 2010.
40. González, ML. Alerta sobre fármacos biocomparables. *El Universal*, sábado 25 de agosto de 2007.
41. Bakke OM, Cladellas CX, García AF. Ensayos clínicos con medicamentos. Fundamentos básicos metodología y práctica. *Doyma*. España, 1994.
42. Monge A. Evolución de los métodos de búsqueda y descubrimiento de fármacos. En: Avedaño LC, editor. *Introducción a la química farmacéutica*. McGraw-Hill 2ª ed., España, 2001.
43. Mayne TJ. Preclinical drug safety evaluation. In: Owen DB, Schucany WR. editors. *Drug safety assessment in clinical trials*. *Marcel Dekker*, USA, 1993.
44. Gad, SC. *Animal Models in Toxicology*. *Taylor and Francis Group*, 2nd ed. USA 2007.
45. Collichio F, Griggs J, Rosenblatt J. Conceptos básicos sobre el desarrollo de los fármacos y los ensayos clínicos. En: Rubin P, Williams J, editores. *Oncología clínica. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. *Elsevier Science* 8ª ed. España, 2003.
46. Clark GW, Brater CD, Johnson AR. *Farmacología médica*. *Mosby*. España, 1993.

47. Klasassen DC. Principios de toxicología y tratamiento de la intoxicación. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editores. Las bases farmacológicas de la terapéutica. *Mc Graw-Hill*. México, 2003.
48. Gutiérrez BJ, López A. Fundamentos de ciencia toxicológica. *Díaz de Santos*. España, 2001.
49. Post OL, Bataller N, Parkhie M, Seller CW. Regulatory toxicology. In: Plumlee KH ed. *Clinical Veterinary Toxicology*. *Mosby*. USA, 2004.
50. Rhodes C. Principles of testing for acute toxic effects. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen T, editors. *General and applied toxicology*. 2<sup>nd</sup> ed., *USA:Grove's Dictionaries*, 2000:321-334.
51. Giráldez DA, Romero VA. Procedimientos experimentales en farmacología y toxicología. En: Zúñiga MJ, Turmarí JA, Milocco SN, Piñeiro R, editores. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. España: *McGraw-Hill Interamericana*. 2001:498-152
52. Fort FL. Animals in Drug Development. In: Swarbrick J, Boylan JC, editors. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol I, *Marcel Dekker*, 2nd ed. USA, 2002.
53. Mayne JT. Preclinical drug safety evaluation. In: Gene SG, editor. *Drug safety assessment in clinical trials*. *USA: Marcel Dekker*, 1993:1-23.
54. Paine JA, Marrs CT. The design of toxicological studies. In: Ballantyne B, Marrs TC, Syversen T, editors. *General and applied toxicology*. *Grove's Dictionaries*, 2a ed. USA, 2000.
55. Fort FL. Animals in drug development. In: Swarbrick J, Boylan JC, editors. *Encyclopedia of pharmaceutical technology* 2<sup>nd</sup> ed. Vol. I, *Marcel Dekker:Illinois* 2002:995-1017.
56. Tabrizi MA, Roskos LK. *Preclinical and Clinical Safety of Monoclonal Antibodies*. AstraZeneca Inc. USA 2007.
57. Food and Drug Administration. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients Redbook* 2000. November 2003.

58. Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJ, Hoffman BB. Farmacología integrada. Madrid, España: *Harcourt Brace*, 1998.
59. Moreno A, Lucena MI. Farmacología clínica: ensayo clínico. En: Velasco MA, Fernández PL, Serrano MJ, Trilles AF, editores. Farmacología. *McGraw-Hil* 16ª ed. España, 1993.
60. Vos R. Drugs Looking for Diseases. *Kluwer Academic Publishers*. Netherlands, 1991.
61. Cato A, Sutton L. Clinical evaluation of drugs. In: Swarbrick J, Boylan JC, editors. Encyclopedia of pharmaceutical technology, 2<sup>nd</sup> ed. Vol I, *Marcel Dekker:Illinois* 2002:440-460.
62. Velasco MA. Introducción: concepto y sinopsis histórica de la farmacología. En: Velasco MA, San Román BS, Serrano JSM, Martínez SR, Cadavid TMI editores. Farmacología fundamental. Madrid: *McGraw-Hill*, 2003:3-12.
63. Rode HJ, Eisel D, Frost I, editors. Roche Applied Science. Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation 3<sup>rd</sup> edition, 2004.
64. NOM-062-ZOO-1999.
65. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes; *J. Appl. Toxicol* 2001; 21: 15-23.
66. European Medicines Agency (EMA) [www.ema.europa.edu](http://www.ema.europa.edu)
67. Jubala CM, Wojcieszyn JW, Valli VEO, et al. CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma. *Vet Pathol*. 2005;42:468-476.
68. Thrall MA, Baker DC, Campbell TW, et al. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. *Lippincott Williams & Wilkins*, USA 2004.
69. Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: Mechanism of Action and Resistance. *Semin Oncol*. 2002;29(2):2-9.
70. Graff SF. Introducción al análisis de orina. En: Análisis de orina. Atlas color. *Editorial Panamericana* 1ª ed., Argentina, 1987.

71. Koscinczuk P, Borda JT, Maruñak S, et al. Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* de Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 2004;64(4):320-324.
72. Hrapkiewicz K, Medina L, Holmes DD. Clinical Laboratory Animal Medicine. An Introduction. *Iowa State Press*, 2nd ed. USA, 1998
73. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2825-33.
74. Meyer DJ, Harvey JW. El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y Diagnóstico. *Inter-Médica* 2ª ed., Argentina, 2000.
75. Harlan Laboratories. Disponible en: <http://www.harlan.com>
76. Stokham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. *Blackwell Publishing* 2nd ed., USA, 2008.