



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

"Pruebas preclínicas de biocomparabilidad de un anticuerpo monoclonal anti HER-2, en ratones y monos (*Macaca mulatta*)"

TESIS

Que para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

María del Carmen Climént Palmer

Tutora:

Laura Cobos Marín

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité tutor:

Laura Patricia Romero Romero

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

María Isabel Gracia Mora

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

México, D.F. Abril, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatorias

A mis papás, Catín y Juan; mis hermanos, Mariana y Juanito y a toda mi familia, por darme tanto cariño y la motivación para prepararme a través de seguir el mejor ejemplo, que son ustedes.

A mis grandes amigas, Cristina, Gaby, Laura, Luz, María, Ximena y Pablo, por acompañarme en esta etapa y convertir mis momentos más estresantes, en razones para reír de la vida y de nosotras mismas.

A Armando, por ser mi amor, mi sueño y mi mejor equipo, hasta para escribir la tesis.

A mis asesoras Laura Cobos, Isabel Gracia y Laura Romero, por prepararme profesionalmente a lo largo de este proceso y por enseñarme que las relaciones laborales también son humanas y sensibles.

A todo el equipo de “Ciencia en todos lados”, por permitirme ser parte del proyecto al tiempo que realizaba mi maestría y por haberme dado el espacio para conocer y desarrollar mi potencial como comunicadora de ciencia, ¡mi más reciente vocación!

Agradecimientos

A mi alma mater UNAM-FMVZ y al CONACYT, por darme el regalo invaluable de la educación.

A todo el equipo Proyecto CAMINA A.C. de la UNIPREC y de la FMVZ-UNAM que formó parte del proyecto, por sus enseñanzas, y por ser parte de este trabajo multidisciplinario que ha sido hasta ahora, uno de mis más grandes retos académicos. Especialmente, gracias a Marisol Rivera Huerta, Lucía Macías Rosales, Francisco Sánchez Bártéz, Mabel Tinoco Méndez y Ana Delia Rodríguez.

A quienes conformaron al jurado evaluador de la tesis: Dr. Édgar Zenteno Galindo, Dra. Jeanet Serafín López, Dra. Samanta Romero Silva, M en C Marisol Rivera Huerta y Dra. Laura Cobos Marín. Gracias por compartirme su conocimiento y experiencias para mejorar este trabajo.

A la Profesor. Monilola Olayioye de la Universidad de Stuttgart, Alemania, por abrirme las puertas para realizar una estancia en su laboratorio, la cual significó un enorme reto que enriqueció mi proyecto, mi formación profesional y mi visión del mundo.

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las principales causas de mortalidad en mujeres a nivel mundial, entre el 15 y 30% de las pacientes sobreexpresan al receptor HER-2, el cual se ha asociado con mal pronóstico ya que promueve el crecimiento y proliferación celular. Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti HER-2 que ofrece una terapia específica que mejora el pronóstico. Los medicamentos biocomparables son bioequivalentes en seguridad y eficacia respecto al medicamento original, pero a menor costo. Este proyecto consistió en la realización de las pruebas preclínicas de un nuevo anticuerpo monoclonal anti HER-2 y del anticuerpo original (Trastuzumab). Se evaluó la toxicidad aguda, toxicidad a dosis repetidas y eficacia *in vivo* para determinar si son biocomparables en términos de seguridad y eficacia. Se establecieron tres grupos experimentales: medicamento de prueba, medicamento de referencia y placebo como control. La toxicidad aguda se evaluó en ratones S.P.F, usando 5 dosis diferentes. Se evaluó signología clínica para identificar cambios fisiopatológicos durante 14 días. El estudio de toxicidad a dosis repetidas se realizó en monos *Macaca mulatta*. Se hicieron electrocardiogramas, pruebas de patología clínica y ELISAs. La eficacia *in vivo* se evaluó en un modelo de xenotrasplante en ratones *nu/nu*, con implante de células SKBR-3. Se midió tamaño tumoral *in vivo* y *ex vivo*. La proliferación, angiogénesis, apoptosis y unión del anticuerpo al receptor fueron evaluadas con inmunohistoquímica. Los tres estudios no mostraron grandes diferencias entre los grupos. Se obtuvieron dos resultados principales en el proyecto: a) el anticuerpo de prueba reconoce al receptor HER-2 (detección *ex vivo* del anticuerpo administrado) y b) ambos medicamentos mostraron seguridad similar en dos especies diferentes. A pesar que el experimento de eficacia *in vivo* no arrojó resultados muy relevantes, permitió establecer una base importante para el desarrollo de futuros experimentos de este tipo.

Palabras clave: *cáncer de mama, receptor HER-2, Trastuzumab, toxicidad, eficacia*

ABSTRACT

Breast cancer is a major cause of death in woman worldwide. Between 15 and 30% of affected patients show an overexpression HER-2 receptor in neoplastic tissue. This protein has been associated with low survival prognosis due to the promotion of growth and proliferation of cancer cells. Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody that targets HER-2 causing apoptosis to cancer cells, improving patient's survival. The development of biocomparable drugs have lower cost with a bioequivalent safety and efficacy to the original product. In the present study, preclinical evaluation of a new monoclonal anti-HER-2 antibody was performed. Acute toxicity, toxicity assessment during multiple dosing and *in vivo* antibody efficacy were evaluated in order to determine safety and efficacy biocomparability. Three experimental groups were established: bioequivalent antibody, original antibody and placebo as control. Acute toxicity was assessed in specific-pathogen-free mice, using 5 different doses. Clinical signology was evaluated to identify physiopathological changes during 14 days. The toxicity study with multiple dosing was undertaken using *Macaca mulatta* monkeys. Cardiovascular evaluation by electrocardiography, clinical pathology and ELISAs were employed. To investigate the *in vivo* efficacy of antibodies, a xenotransplant model of breast cancer (SKBR-3 cell line) in *nu/nu* mice was used. *In vivo* and *ex vivo* measurements of tumoral size were performed. Proliferation, angiogenesis, apoptosis and antibody binding were determined by immunohistochemistry. The three studies did not show major differences amongst groups. Two main outcomes were obtained during this research project: a) the testing antibody recognized the receptor HER-2 (*ex vivo* detection of injected antibody) and b) both drugs showed similar safety in two different species. Although the *in vivo* experiment to evaluate efficacy did not show a major outcome, it is an important foundation for the development of future *in vivo* efficacy experiments.

Key words: Brest cancer, HER-2 receptor, Trastuzumab, drug toxicity and efficacy

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Cáncer	5
1.1.1 Generalidades del cáncer	5
1.1.2 Cáncer de mama	6
1.2 Receptor HER-2	7
1.2.1 Ligandos de los receptores tirosín cinasa	7
1.2.2 Función normal de HER-2	8
1.2.3 HER-2 en cáncer de mama	9
1.3 Trastuzumab	15
1.3.1 Generalidades	15
1.3.2 Mecanismos de acción	15
1.3.3 Resistencia a Trastuzumab	22
1.4 Respuesta inmune en cáncer	22
1.4.1 Antecedentes y generalidades	22
1.4.2 Inmunidad innata contra tumores	25
1.4.3 Inmunidad adaptativa contra tumores	25
1.4.4 Mecanismos de escape	25
1.4.5 Inflamación crónica y desarrollo del cáncer	27
1.4.6 Inmunidad innata y desarrollo del cáncer	28
1.4.7 Inmunidad adaptativa y desarrollo del cáncer	28
1.4.8 Complemento y desarrollo del cáncer	29
1.4.9 Respuesta inmune en la progresión del cáncer de mama	31
1.5 Pruebas preclínicas para anticuerpos monoclonales	32
2. ESTUDIOS DE SEGURIDAD: TOXICIDAD AGUDA	35
2.1 Introducción	35
2.2 Objetivo	35
2.3 Metodología	36
2.3.1 Producto de prueba:	36
2.3.2 Condiciones de alojamiento y alimentación	36
2.3.3 Diseño Experimental	37
2.4 Resultados	38

2.4.1 Registro de signos:	38
2.4.2 Registro de peso corporal.....	40
2.5 Discusión.....	41
2.6 Conclusiones.....	42
3. ESTUDIOS DE SEGURIDAD: TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS	43
3.1 Introducción.....	43
3.2 Objetivos.....	44
3.3 Metodología.....	44
3.3.1 Selección de la especie animal	44
3.3.2 Condiciones de alojamiento y alimentación.....	45
3.3.3 Diseño del estudio:.....	45
3.3.4 Preparación de las dosis	49
3.3.5 Toma de muestras, constantes fisiológicas y electrocardiograma	49
3.3.6 Procesamiento de muestras	51
3.3.7 Análisis estadístico	54
3.4 Resultados	54
3.4.1 Tolerabilidad local.	54
3.4.2 Pesos.....	54
3.4.3 Hemogramas.....	56
3.4.4 Bioquímicas	59
3.4.5 Creatina cinasa (CK).....	61
3.4.6 Electrocardiograma (ECG)	62
3.4.7 Inmunogenicidad	66
3.5 Discusión.....	70
3.6 Conclusiones.....	73
4. ESTUDIOS DE EFICACIA: EFICACIA <i>IN VIVO</i>.....	74
4.1 Introducción.....	74
4.2 Objetivos.....	77
4.3 Metodología.....	77
4.3.1 Productos de prueba:.....	77
4.3.2 Recepción de los animales	78
4.3.3 Cultivo celular y preparación del implante	78
4.3.4 Reconstitución de los medicamentos.	79
4.3.5 Desarrollo tumoral	79
4.3.6 Necropsia e histopatología	82

4.3.7 Inmunohistoquímica.....	83
4.3.8 Análisis estadístico	85
4.4 Resultados	86
4.4.1 Desarrollo tumoral.....	86
4.4.2 Necropsias e histopatología	89
4.4.3 Inmunohistoquímica.....	92
4.5 Discusión.....	98
4.6 Conclusiones.....	100
5. DISCUSIÓN GENERAL	101
6. ANEXO: proyecto de estancia en la Universidad de Stuttgart	107
6.1 Introducción.....	107
6.2 Objetivos.....	110
6.3 Hipótesis.....	110
6.4 Material y métodos	110
6.5 Resultados	113
6.6 Discusión.....	122
6.7 Conclusiones.....	125
LITERATURA CITADA.....	128

LISTA DE CUADROS

CUADRO 2.1 ESQUEMA DE DOSIS	37
CUADRO 2.2 SIGNOLOGÍA POSADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS.	39
CUADRO 3.1 GRUPOS DE ESTUDIO PARA TOXICIDAD A DOSIS MÚLTIPLES	46
CUADRO 3.2 REGISTRO DE LAS HEMBRAS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO	47
CUADRO 3.3 REGISTRO DE LOS MACHOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO	48
CUADRO 3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE HEMOGRAMAS EN MONOS DE AMBOS SEXOS	57
CUADRO 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE QUÍMICA SANGUÍNEA EN MONOS DE AMBOS SEXOS	60
CUADRO 3.6 PRUEBAS DE ELISA EN MONOS ENFRENTADOS CON MEDICAMENTO DE PRUEBA.	68
CUADRO 3.7 PRUEBAS DE ELISA EN MONOS ENFRENTADOS CON MEDICAMENTO DE REFERENCIA	69
CUADRO 4.1 DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES POR GRUPO DE TRATAMIENTO	81
CUADRO 4.2 ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DEL MODELO	87
CUADRO 4.3 VOLUMEN TUMORAL (MM ³) EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS	87
CUADRO 4.4 MEDIAS DEL VOLUMEN TUMORAL EX VIVO DE LOS TRES TRATAMIENTOS.....	91
CUADRO 4.5 RESULTADOS DE LA IHQ CON EL MARCADOR ANTI CD31	93
CUADRO 4.6 RESULTADOS DE LA IHQ A LOS DIFERENTES MARCADORES	97
CUADRO 6.1 ANTICUERPOS PRIMARIOS	112
CUADRO 6.2 ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	112

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 LÍNEAS DE CRECIMIENTO RATONES HEMBRAS Y MACHOS.	40
FIGURA 2.2 INTERVALOS DE CONFIANZA PARA MEDIAS DE PESOS	41
FIGURA 3.1 MEDIAS MARGINALES Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DEL PESO DE LOS MONOS	55
FIGURA 3.2 MEDIAS MARGINALES Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE PESOS DE MONOS	56
FIGURA 3.3 DETERMINACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA (FA) EN EL GRUPO DE MEDICAMENTO DE PRUEBA .	61
FIGURA 3.4 DIAGRAMA DE CAJAS DE CK DE TODOS LOS MONOS, EN LAS 8 SEMANAS DEL ESTUDIO.	62
FIGURA 3.5 ECG CON PATRÓN NORMAL	63
FIGURA 3.6 ECG CON PATRÓN ALTERADO.....	64
FIGURA 3.7 ECG CON CAMBIOS EN LA POLARIDAD DE LA ONDA T.	65
FIGURA 3.8 DIAGRAMA DE CAJA DE LA AMPLITUD DE LA ONDA S, ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.	66
FIGURA 4.1 DESARROLLO TUMORAL	81
FIGURA 4.2 MEDICIÓN DEL TUMOR CON VERNIER.....	82
FIGURA 4.3 MEDIAS Y ERRORES ESTÁNDAR DEL VOLUMEN TUMORAL (MM ³)	88
FIGURA 4.4 LÍNEAS DE CRECIMIENTO DEL VOLUMEN TUMORAL EN MM ³	89
FIGURA 4.5 MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DEL VOLUMEN TUMORAL (CM ³) EX VIVO.....	91
FIGURA 4.6 INMUNOHISTOQUÍMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO ANTI HER-2	92
FIGURA 4.7 INMUNOHISTOQUÍMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO ANTI CD31.....	93
FIGURA 4.8 RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE CD31	94
FIGURA 4.9 INMUNOHISTOQUÍMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO ANTI IGG HUMANA.	94
FIGURA 4.10 INMUNOHISTOQUÍMICA EMPLEANDO EL ANTICUERPO ANTI Ki67.....	95
FIGURA 4.11 INMUNOHISTOQUÍMICA EN LA PRUEBA DE TUNEL	96
FIGURA 4.12 RESULTADOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA: IGG, Ki67 Y TUNEL	96
FIGURA 6.1 EXPRESIÓN DE PHLPP1 Y PHLPP2 EN CÉLULAS MCF-7.	113
FIGURA 6.2 EXPRESIÓN DE PHLPP1 Y PHLPP2 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.	113
FIGURA 6.3 WB DEL EXPERIMENTO A.....	114
FIGURA 6.4 EXPERIMENTO A.1. CUANTIFICACIÓN DE PAKT T308/TUBULINA	115
FIGURA 6.5 EXPERIMENTO A.2. CUANTIFICACIÓN DE PAKT T308/TUBULINA	115
FIGURA 6.6 EXPERIMENTO A.3. CUANTIFICACIÓN DE PAKT T308/TUBULINA	116
FIGURA 6.7 EXPERIMENTO A.1. CUANTIFICACIÓN DE PAKT S473/TUBULINA	116
FIGURA 6.8 EXPERIMENTO A.2. CUANTIFICACIÓN DE PAKT S473/TUBULINA	117
FIGURA 6.9 EXPERIMENTO A.3. CUANTIFICACIÓN DE PAKT S473/TUBULINA	117
FIGURA 6.10 WB DEL EXPERIMENTO B.....	118
FIGURA 6.11 EXPERIMENTO B.1. CUANTIFICACIÓN DE PAKT T308/TUBULINA	119
FIGURA 6.12 EXPERIMENTO B.2 CUANTIFICACIÓN DE PAKT T308/TUBULINA	119
FIGURA 6.13 EXPERIMENTO B.1. CUANTIFICACIÓN DE PAKT S473/TUBULINA	120
FIGURA 6.14 EXPERIMENTO B.2. CUANTIFICACIÓN DE PAKT S473/TUBULINA	120
FIGURA 6.15 MEDIAS DEL EXPERIMENTO A, PARA PAKT S473/TUBULINA.	121
FIGURA 6.16 MEDIAS DEL EXPERIMENTO B, PARA PAKT S473/TUBULINA.	121
FIGURA 6.17 INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS MCF-7	122

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia de mayor prevalencia en mujeres y es el responsable de cerca de medio millón de muertes por año en el mundo (WHO, 2015). Son muchos los factores genéticos y ambientales los que pueden estar involucrados en el desarrollo de este tipo de cáncer. Uno ampliamente descrito, es la sobre expresión del receptor HER-2. Éste es un receptor de tipo tirosín cinasa, que pertenece a la familia de receptores ErbB. Tiene importantes funciones durante la gestación y en la vida adulta, sin embargo, cuando se encuentra sobreexpresado y activado, da lugar a procesos patológicos fundamentales en el cáncer, como aumento de la proliferación y sobrevivencia celular, angiogénesis y metástasis (Olayioye et al., 2000).

Entre el 15 y 30% de las pacientes con cáncer de mama sobreexpresan HER-2, en estos casos se ha identificado un peor curso de la enfermedad y mal pronóstico; por lo que su inhibición se ha vuelto un blanco de acción de varias terapias. El tratamiento del cáncer de mama, como muchos otros, se basa en procedimientos como la quimio o radioterapia, los efectos secundarios de éstos suelen ser muy agresivos. HER-2 como blanco terapéutico ofrece la oportunidad de una terapia altamente específica con menos efectos secundarios, tal es el caso de los anticuerpos monoclonales dirigidos a este receptor (Cobleigh et al., 1999).

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce e inhibe la actividad del receptor HER-2 y ha mostrado muy buenos resultados en combinación con otras terapias. Este anticuerpo monoclonal salió al mercado en la década de los 90's con el nombre al público de Herceptin (Roche, 2010). Sin embargo, su elevado costo lo hace inaccesible para muchas pacientes. Los buenos resultados obtenidos con Trastuzumab, aunado a su alto costo, han incrementado el interés por desarrollar un medicamento biocomparable; que brinde una terapia eficiente a menor precio.

Actualmente diferentes empresas farmacéuticas alrededor del mundo están desarrollando el biocomparable de Trastuzumab, con la finalidad de tenerlo al mercado. La empresa Celltrion recibió la aprobación para el anticuerpo monoclonal Herzuma por parte de la Administración de Alimentos y Medicinas de Corea (KFDA en inglés) en enero del 2014 (CELLTRION, 2014). Recientemente, una empresa farmacéutica mexicana, también se propuso el desarrollo de dicho biocomparable.

De acuerdo con la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS, se entiende por biocomparable el medicamento biotecnológico no innovador que muestre equivalencia en términos de calidad, seguridad y eficacia al medicamento biotecnológico de referencia, aspectos que deben evaluarse por medio de pruebas analíticas, preclínicas y clínicas (COFEPRIS, 2013).

Con esta tesis se buscó comparar el medicamento de referencia (Trastuzumab/Herceptin) con el de prueba (elaborado por una empresa farmacéutica mexicana) y determinar si son biocomparables a través de realizar estudios preclínicos de seguridad, por medio de pruebas de toxicidad aguda, y toxicidad a dosis repetidas, así como eficacia *in vivo*. Cabe mencionar que se realizaron pruebas de eficacia *in vitro* en el Instituto Politécnico Nacional, pero dichos estudios no son parte de este proyecto de Maestría.

Hipótesis:

El medicamento de referencia y el de prueba son biocomparables, basado en las pruebas de toxicidad aguda, toxicidad a dosis repetidas y eficacia *in vivo*.

Objetivos generales:

Comparar si el medicamento de prueba y el de referencia causan una respuesta semejante en un ensayo de toxicidad aguda en ratón.

Comparar si el medicamento de prueba y el de referencia causan una respuesta semejante en un ensayo de toxicidad a dosis repetidas en monos *Macaca mulatta*.

Comparar si el medicamento de prueba y el de referencia causan una respuesta semejante en un ensayo de eficacia *in vivo* en un modelo de xenotrasplante murino.

Objetivos particulares:

Comparar la inmunogenicidad en monos del medicamento de prueba con el de referencia, para demostrar si éstos son biocomparables.

Comparar la capacidad de reducir el tamaño tumoral del medicamento de prueba con el de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplante, para demostrar si éstos son biocomparables.

Comparar la capacidad anti angiogénica *in vivo* del medicamento de prueba con el de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplante, para demostrar si éstos son biocomparables.

Comparar la capacidad de unión a HER-2/neu del medicamento de prueba con el de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplante, para demostrar si éstos son biocomparables.

Comparar la capacidad de inducir apoptosis del medicamento de prueba con el de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplante, para demostrar si éstos son biocomparables.

Comparar la capacidad de inhibir la proliferación celular del medicamento de prueba con el de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplatación, para demostrar si éstos son biocomparables.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cáncer

1.1.1 Generalidades del cáncer

El cuerpo de un animal opera como una sociedad o un ecosistema, donde debe haber un comportamiento coordinado entre todas las células que lo habitan. Para lograrlo, las células envían, reciben e interpretan señales que sirven como controles sociales. En el cáncer estos mecanismos se ven perturbados. El cáncer es una enfermedad genética donde una mutación o un cambio epigenético en el DNA provee a la célula ventajas adaptativas que le permiten disminuir la apoptosis o incrementar su proliferación. (Alberts, 2008).

El cáncer puede dividirse en tres etapas. La primera de ellas es la iniciación, en ésta la célula adquiere un cambio genético que le da la ventaja de disminuir su apoptosis o incrementar su replicación. La segunda etapa es la promoción, donde las células comienzan a proliferar y adquirir mayor número de mutaciones y por lo tanto, más ventajas sobre las demás células. La tercera etapa es la progresión, ésta es la declaración formal del cáncer, se caracteriza por un crecimiento incontrolado de las células. Cualquier tipo de cáncer se llevará a cabo en un microambiente inflamatorio, pues la liberación de diferentes citocinas como TNF α , IL-10, IL-6, IL-17 y NF- κ B, estimulan la proliferación, crecimiento celular, angiogénesis y dan ventajas para la metástasis (Alberts, 2008).

Se han identificado diferentes agentes carcinogénicos, lo cuales funcionan ya sea como iniciadores o como promotores. De manera general se pueden agrupar en: radiaciones, inflamación, virus y agentes químicos. Cualquiera de ellos actuará en los denominados "genes críticos de cáncer", aquéllos que al mutar, darán lugar a la enfermedad. Éstos pueden ser protooncogenes o genes supresores de tumor (Alberts, 2008).

La mutación en un protooncogen da lugar a un oncogen y resulta en una señal de mayor proliferación celular, mientras que la mutación en un gen supresor de tumor, resulta en la pérdida de función, donde la célula merma la señal de inhibición por lo que se mantiene dividiéndose.

En este último caso, se requiere de la mutación en ambos progenitores para que el cáncer se manifieste (Alberts, 2008).

La conversión de un protooncogen a un oncogen se puede dar por diferentes mecanismos, los principales son: deleción en un gen crítico de cáncer, mutación en la secuencia reguladora de un gen, multiplicación o sobreexpresión de un gen o por un rearrreglo de cromosomas.

1.1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama se ha mantenido como la neoplasia de mayor prevalencia en mujeres y es el responsable de cerca de medio millón de muertes por año en el mundo.

Es una enfermedad genética y clínicamente heterogénea. Con el fin de organizar dicha heterogeneidad se han desarrollado una clasificación.

En general se puede categorizar en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo. El cáncer de mama *in situ*, a su vez se clasifica en ductal o lobular, dependiendo de los patrones de crecimiento y las características celulares. El carcinoma *in situ* ductal (DICS) es más común que el lobular (LICS). Actualmente se ha desarrollado una clasificación más específica con el fin de tomar decisiones terapéuticas. Para esto se consideran diferentes marcadores moleculares como receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), Her-2 y p53. En el caso del carcinoma invasivo, éste se subdivide en ductal infiltrante, invasivo lobular, ductal/lobular, coloidal, tubular, carcinoma medular y papilar. De éstos, el carcinoma ductal infiltrante (IDC) es, por mucho, el más común (70-80% de las lesiones invasivas). Éste a su vez se subclasifica en bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciado (grado 2) o pobremente diferenciado (grado 3). En el cáncer invasivo se utilizan los mismos marcadores moleculares para clasificarlos más específicamente (Malhotra et al., 2010).

La importancia de clasificar correctamente el tipo de cáncer de mama, radica en poder seleccionar adecuadamente la terapia. Por ejemplo, pacientes ER⁺/PR⁺ son candidatas para tamoxifeno o inhibidores de aromatasa y las HER-2⁺ son candidatas para Trastuzumab (Malhotra et al., 2010).

Entre el 15 y el 30% de los casos presenta una sobre expresión del oncogen Her-2/neu, que da lugar a la sobre expresión del receptor HER-2, central en este proyecto (Alberts, 2008, Kim and Muller, 1999).

1.2 Receptor HER-2

Este receptor pertenece a la familia de receptores ErbB. El oncogen erbB fue descubierto en el virus de la eritroblastosis aviar y posteriormente su presencia fue descrita en varios tipos de cáncer humanos, como carcinoma de estómago, de cerebro y de mama (Weinberg, 2013). En 1981 se identificó a este oncogen en células del neuroblastoma de ratón con transfección de fibroblastos 3T3, de ahí deriva su nombre “Her-2/neu”. En el genoma humano se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 17, específicamente en la región 17q12-212. Codifica para la glicoproteína de 185 KDa de tipo tirosín cinasa, HER-2, un receptor de superficie que funciona como un transductor de señales al convertir señales extracelulares en intracelulares, modificando así el comportamiento de la célula blanco. HER-2 pertenece al grupo de receptores de la familia ErbB (Kim and Muller, 1999, Menard et al., 2003).

Dentro de los receptores tirosín cinasa de la familia ErbB, se distinguen cuatro tipos: el HER-1 o EGFR (epidermal growth factor receptor o factor de crecimiento epidérmico) también conocido como ErbB, HER-2 o ErbB2/HER2/Neu, HER-3 o ErbB3 y el HER-4 o ErbB4 (Riese and Stern, 1998).

Los receptores HER, están conformados por un dominio extracelular, al que se une el ligando, un dominio transmembranal y uno intracelular, el cual tiene la actividad cinasa. HER-2 se caracteriza por ser un receptor huérfano ya que no tiene un ligando directo conocido, y HER-3 carece de actividad cinasa en el dominio intracelular (Olayioye et al., 2000).

1.2.1 Ligandos de los receptores tirosín cinasa

Los receptores de tirosín cinasa tienen varios ligandos, los principales son: factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), insulina, factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF1), factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF) y factor de crecimiento nervioso (NGF) (Alberts, 2008).

En el caso específico de la familia ErbB, se distinguen tres grupos funcionales de ligandos, dada su capacidad de unirse y activar a uno u otro receptor de la familia. En el primer grupo se encuentran el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y la amfiregulina (AR), los cuales son capaces de unir y activar homodímeros del EGFR y a heterodímeros de éste con otros receptores de esta familia. En un segundo grupo están las neorregulinas 1 y 2 (NRGs-1, NRGs-2), las cuales se unen a homodímeros de ErbB3 o de ErbB 4 y a heterodímeros de éstos con otros receptores de esta familia. El tercer grupo de ligandos está formado por la betacelulina (BTC), la epirregulina (EPR) y el factor similar al factor de crecimiento epidermal de unión a heparina (HB-EGF), que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de Erb4, como a heterodímeros de cada uno de ellos con otros miembros de la familia. El HER-2 es, sin embargo, un receptor huérfano que carece de ligando directo conocido, aunque es activado por EGF, TGF- α , BTC o NRGs cuando se heterodimeriza con el EGFR o ErbB4 (Riese and Stern, 1998, Alroy and Yarden, 1997).

1.2.2 Función normal de HER-2

La familia de receptores Erb B, en células normales, detona una red de diferentes vías de señalización que controlan el crecimiento celular normal, diferenciación, motilidad y adhesión en varios tipos de células.

El receptor HER-2 tiene importantes funciones tanto durante la gestación como en la vida adulta. En la gestación participa en una red involucrada en dos tipos de interacciones: comunicación cruzada entre mesénquima y epitelio; y efectos neuronales en células blanco, tales como músculo, astroglioa, oligodendrocitos y células de Schwann. A través de estudios en ratones deficientes en HER-2, se ha comprobado que el receptor juega un papel crucial durante la gestación en el desarrollo del sistema cardiovascular, sistema nervioso y glándula mamaria (Menard et al., 2004, Olayioye et al., 2000)

Los túbulos T de los cardiomiocitos tienen una alta expresión de HER-2. Hay estudios con mutaciones condicionadas de HER-2 en cardiomiocitos ventriculares, que han demostrado que esta condición provoca cardiomiopatía dilatada severa con disfunción cardíaca, la cual generalmente aparece en el segundo mes posnacimiento. Debido a esto se ha concluido que HER-2 es crucial para la función cardíaca durante la vida adulta. (Menard et al., 2004).

En la glándula mamaria normal, los receptores HER participan en la regulación del crecimiento, diferenciación, apoptosis y remodelación. Los diferentes ligandos se expresan con patrones temporales en distintas etapas del desarrollo, maduración e involución de la glándula mamaria. HER-1 y HER-2 muestran una mayor expresión durante la pubertad, por lo que se piensa que están más involucrados en el desarrollo, mientras que HER-3 y HER-4 tienen mayor actividad durante la gestación y lactancia. Las principales vías activadas por HER-2 involucradas en el desarrollo de la glándula mamaria son la de IP3K para la formación de túbulos y la de MAPK para la morfogénesis alveolar (Menard et al., 2004).

En un tejido sano, los receptores HER están controlados por varios mecanismos que aseguran una señalización adecuada: desfosforilación del receptor, disociación del ligando, regulación a la baja de los receptores dada por endocitosis. Este último puede culminar en lisosomas para la degradación del receptor (promoviendo la atenuación de la señal) o en el reciclaje del receptor hacia la membrana plasmática (resultando en potencialización de la señalización) (Olayioye et al., 2000).

1.2.3 HER-2 en cáncer de mama

El primer tipo de tumor estudiado para la alteración del oncogen HER-2 fue el carcinoma mamario. Entre el 15 y el 30% de las pacientes con cáncer de mama sobreexpresan HER-2, es decir, marcan un resultado 3+. Esto se determina a través de inmunohistoquímica (IHQ) o de amplificación génica con hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Roy and Perez, 2009).

En células normales, la formación de heterodímeros entre HER-2 y algún otro receptor HER, así como su activación, es temporal y está controlada. En cáncer los mecanismos de control de HER-2, previamente descritos, están disminuidos y las redes de señalización del receptor se encuentran alteradas. Se promueve la proliferación por la vía de MAPK y la sobrevivencia celular por el reclutamiento de la vía IP3K. Emergen nuevas vías de regulación negativa sobre el RALT (del inglés, Receptor-associated late transducer), el cual normalmente es capaz de suprimir las vías de proliferación y sobrevivencia. Además, las células que sobreexpresan al receptor presentan secreción autócrina o parácrina de ligandos, proveyendo de ventajas de crecimiento a las células.

La acción tumorigénica de HER-2 no se limita a su poder proliferativo, HER-2 también es un factor promotor de angiogénesis y metástasis (Menard et al., 2004).

La sobre expresión de HER-2 se ha asociado a un peor curso de la enfermedad y a un mal pronóstico, por lo que su inhibición se ha vuelto el blanco de acción de varias terapias. La acción de HER-2 se puede bloquear a diferentes niveles: con anticuerpos monoclonales a través de la unión al dominio extracelular, bloqueando su dimerización a través de la inhibición del dominio cinasa; o interrumpiendo cascadas de señalización (Roy and Perez, 2009).

1.2.3.1 Activación de HER-2

La unión del ligando al receptor tirosín cinasa provoca que las cadenas del receptor se dimericen, dejando juntos a dos dominios de cinasa, de dos cadenas de receptores, lo que provoca una fosforilación cruzada en múltiples tirosinas. A este proceso se le denomina transautofosforilación, con lo que se da la activación del receptor.

La fosforilación cruzada de las colas citosólicas de los receptores, contribuye a la activación del receptor de dos maneras: la primera, la fosforilación de las tirosinas a través del dominio cinasa incrementa la actividad cinasa de la enzima y la segunda, la fosforilación de las tirosinas, fuera del dominio cinasa, crea una alta afinidad para la unión de proteínas de señalización intracelulares, donde cada proteína de señalización se unirá a un sitio específico fosforilado. Cuando la proteína se une al receptor activado en una tirosina fosforilada, ésta será a su vez fosforilada y por lo tanto activada, iniciando una cascada de señalización (Alberts, 2008).

Al igual que otros receptores pertenecientes a la familia de ErbB, HER-2 es inactivo cuando está presente en forma monomérica. Su activación requiere de la formación de dímeros u oligómeros. Existen dos mecanismos que regulan la formación de los dímeros de HER-2, uno de ellos consiste en la sobre expresión (ciento de veces más que en células normales) del receptor en las células tumorales. Esto favorece que el receptor se dimerice (homodimerización) y se encuentre constitutivamente activado. El otro mecanismo se relaciona con la heterodimerización del receptor con otros receptores de la misma familia: EGFR, HER3 o HER4, lo cual multiplica los ligandos que pueden unirse al receptor dimerizado. Lo anterior explica la señalización a través de HER-2 aun cuando no existe un ligando específico para él. Posterior a la dimerización (homo o hetero) ocurre la

autofosforilación que provoca una cascada de eventos bioquímicos involucrados en la regulación de funciones celulares como la proliferación, sobrevivencia, angiogénesis y metástasis (Menard et al., 2003, Lange et al., 2011).

La unión del ligando, y la fosforilación, tiene como consecuencia la activación de diferentes vías de señalización importantes: MAPK y PI3K, responsables de la proliferación y sobrevivencia celular, respectivamente (Menard et al., 2003, Lange et al., 2011).

1.2.3.2 HER-2 induce proliferación celular

Cuando HER-2 se encuentra activado se recluta la vía mitogénica de MAPK (mitogen-activated protein kinases) inductora de proliferación celular.

La superfamilia Ras, consiste en una familia de varias GTPasas monoméricas. Éstas son activadas por el receptor tirosín cinasa, HER- 2. La activación se da ante el acoplamiento indirecto entre el receptor tirosín cinasa y Ras. Las Ras, activan a su vez a la vía de señalización de las MAPK. Este sistema tiene tres componentes principales: el primero es MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) (Raf), éste es activado directamente por Ras por medio de una fosforilación. Posteriormente activa al segundo componente, MAP kinase kinase (MAPKK) (Mek), ésta fosforila y por lo tanto activa a MAP kinasa (MAPK) (Erk), la última cinasa de la serie. Una vez que la MAPK se encuentra activada, ésta detona una cascada de señalización que culmina en la fosforilación de proteínas regulatorias de genes, modificando patrones de expresión génica. Los genes activados por esta vía están relacionados a la estimulación de la proliferación celular, tal es el caso de aquellos que codifican para la ciclina G1, requerida para llevar a la célula al punto de restricción y que se pueda duplicar (Olayioye et al., 2000, Alberts, 2008)

1.2.3.3 HER-2 induce sobrevivencia celular

La activación de HER-2 da lugar a la activación de la vía de PI3K con lo que inhibe la apoptosis celular y por lo tanto, promueve la sobrevida (Kim and Muller, 1999, Menard et al., 2003).

Cuando el receptor se encuentra dimerizado y en su forma activa, habrá un sitio de unión en una tirosina fosforilada específica para la unión de otra cinasa: PI3K. Ésta da lugar a la formación de PI (3, 4, 5) P₃. PIP₃ recluta a dos proteínas cinasas hacia la membrana plasmática: Akt y PDK1, provocando la activación de Akt. Una vez activa, la Akt fosforila a varias proteínas de la membrana plasmática así como del citosol y núcleo. El efecto es la

inactivación de diferentes proteínas, y todas las acciones de Akt incrementan la sobrevivencia y crecimiento celular. Un efecto específico de Akt consiste en la fosforilación de la proteína *Bad*, la cual, en un estado desfosforilado, promueve la muerte celular por apoptosis. La fosforilación de *Bad* provocada por Akt, crea sitios de unión para una proteína llamada 14-3-3, ésta secuestra a la *Bad* fosforilada, impidiendo que actúe y por lo tanto, promoviendo la sobrevivencia celular (Olayioye et al., 2000, Menard et al., 2003, Kim and Muller, 1999, Alberts, 2008).

1.2.3.4 HER-2 promueve metástasis y angiogénesis

El receptor incrementa el potencial metastásico del tumor promoviendo la secreción de enzimas degradadoras de la membrana basal (metaloproteasas MMP's). Esto provoca la ruptura de la matriz al impedir las uniones célula- matriz y célula-célula, con lo cual se facilita la comunicación entre células tumorales y su pérdida de control.

La matriz extracelular (MEC) es el medio en el que se encuentran inmersas las células de tejido conectivo. Su función es mucho más que la de proveer soporte físico, juega un importante rol en el comportamiento celular, influencia en la sobrevivencia, desarrollo, migración, proliferación y función celular. La MEC está formada por la sustancia fundamental y fibras, ambos componentes son sintetizados principalmente por los fibroblastos (Alberts, 2008).

La sustancia fundamental se compone por proteoglicanos, que consisten en una proteína unida a un glucosaminoglicano. Los glucosaminoglicanos (GAGs) son cadenas de polisacáridos compuestas por unidades repetidas de disacáridos, siempre tienen un azúcar amino (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) y grupos sulfato o carboxilo, razón por la cual los GAGs son moléculas de carga negativa. Se distinguen cuatro grupos principales de GAGs: ácido hialurónico, condroitín sulfato y dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato. Excepto el ácido hialurónico, todos los GAGs se encuentran unidos covalentemente a una cadena polipeptídica, formando así el proteoglicano.

Los proteoglicanos juegan un rol muy importante en la señalización química entre células, se unen a moléculas de señalización como factores de crecimiento y controlan su difusión a través de la matriz (Alberts, 2008).

La MEC tiene cuatro tipos de fibras: colágena, elastina, fibronectina y laminina. La colágena es la más abundante, forma una malla a través de fibras longitudinales y

transversales, su principal función es dar resistencia a la tracción. La elastina, como su nombre lo sugiere, son fibras con la capacidad de estirarse y acortarse por lo que dan resistencia a la presión. La fibronectina juega un papel importante entre la unión célula-matriz dado que se une a integrinas. Finalmente la laminina forma la estructura básica de la lámina basal, tiene dominios de unión tanto para los proteoglicanos de la matriz como para las integrinas de las células epiteliales (Alberts, 2008).

Las cadherinas son una familia de proteínas dependientes de calcio que participan en la unión célula a célula. Forman uniones homofílicas. Si se encuentran unidas a actina forman uniones adherentes, y si se encuentran unidas a filamentos intermedios, forman desmosomas. Participan también en otros tipos de uniones celulares como en el cinturón adherente, que puede coordinar el movimiento del citoesqueleto con células vecinas y uniones estrechas que son típicas de epitelios (Alberts, 2008).

Metástasis

Para que las células tumorales migren hacia otros tejidos tienen que darse una serie de eventos, los principales son: transformación del tejido de mesenquimatoso a epitelial a través de la expresión de factor de crecimiento transformante β , desprendimiento de las células por mutación de cadherinas, destrucción de la matriz extracelular por medio de metaloproteasas para aumentar la permeabilidad del tejido, abandono del tejido y llegada a vasos sanguíneos, sobrevivencia en el torrente sanguíneo (se requiere la expresión de TNF y eipirregulina), expresión de integrinas para adherirse al vaso sanguíneo y salir de la circulación, establecimiento en un nuevo tejido y finalmente llevar a cabo la angiogénesis (Alberts, 2008, Weinberg, 2013).

Metaloproteasas (MMP's) y metástasis

Las células deben ser capaces no sólo de sintetizar la matriz extracelular sino también de degradarla. Una rápida degradación de la MEC es requerida en procesos como la reparación de tejidos. Para una célula, desde el punto de vista individual, la capacidad de degradación de la MEC es crucial para poder dividirse, así como para poder desplazarse a través de la matriz. Si la célula carece de las enzimas necesarias para esto, no podrá dividirse ni tendrá la capacidad de migrar. Por lo tanto, la degradación de la matriz en el cáncer, es uno de los eventos fundamentales para que las células tumorales hagan metástasis y proliferen en los tejidos que invadan.

De manera general los componentes de la MEC son degradados por enzimas proteolíticas extracelulares. La mayoría de estas proteasas pertenecen o a las metaloproteasas de matriz (MMP's), las cuales dependen de Ca^{2+} o de Zn^{2+} para su actividad; o a las serín proteasas, que tienen una serina de alta actividad en su sitio activo. Ambos tipos de proteasas cooperan para degradar proteínas de la matriz, principalmente colágena, fibronectina y laminina.

La actividad de las proteasas tiene tres mecanismos de control. El primero es la activación local, hay proteasas que se secretan como precursores inactivos y se activan de manera local cuando se requieren. El segundo mecanismo es el confinamiento por receptores de superficie celular, estos receptores, incluidos los tipo tirosín cinasa, confinan a la enzima en los sitios donde es necesario, promoviendo la migración celular. El tercer y último mecanismo de control es a través de la secreción de inhibidores de proteasas, estos son proteasa- específicos, se unen estrechamente bloqueando su actividad (Alberts, 2008).

Potencial metastásico de HER-2

La acción tumorigénica de HER-2 no está limitada a su potencial de efecto proliferativo antes descrito, sino que también ha mostrado ser un factor promotor de metástasis. Un incremento en los receptores HER-2 activados ha comprobado una mayor invasividad *in vitro* y mayor metástasis *in vivo*. La razón por la cual HER 2 incrementa el potencial metastásico radica en su habilidad para promover la secreción de enzimas degradativas de la matriz extracelular, particularmente las metaloproteasas (MMP's), descritas anteriormente. Éstas determinan cambios estructurales en la matriz; que afectan la función de las cadherinas (con lo que se modifica la unión célula- célula) y de las integrinas, alterando las uniones célula- matriz.

Estas perturbaciones facilitan la comunicación entre las células tumorales y el escape de su microambiente. Como consecuencia surgirán nuevas interacciones entre el receptor HER e integrinas, activando la vía PI3K, lo que induce la liberación de segundos mensajeros que a su vez activan complejos protéicos con efectos en la reorganización de la actina del citoesqueleto. Esto provee a la célula tumoral la capacidad de alterar su forma y movimiento para poder migrar (Menard et al., 2003).

Angiogénesis inducida por HER-2

Los tumores necesitan asegurarse de recibir el suficiente riego sanguíneo para tener un rico aporte de oxígeno y de nutrientes. Las células tumorales tienen la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos a través de emitir señales angiogénicas. Dichas señales se producen en respuesta a la hipoxia, la que se incrementa en el centro del tumor conforme éste crece. HER-2 activado recluta a la vía PI3K la cual a su vez activa al Factor inducible por Hipoxia -1 α (HIF - 1 α), una proteína reguladora de genes. Esta proteína, a su vez activa la transcripción de genes que codifican para factores proangiogénicos como el factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), que estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, y con esto no sólo incrementa la irrigación sino también la posibilidad de metástasis (Alberts, 2008).

1.3 Trastuzumab

1.3.1 Generalidades

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, esto es, un anticuerpo que, a través de ingeniería genética, se formó tras la inserción de las regiones determinantes de complementariedad (CDR's) a una IgG 1 humana. Fue desarrollado en Genetech (South San Francisco CA).

Reconoce un epítotope del dominio II de la región extracelular de HER-2 que es rico en cistina y muy cercano a la región transmembranal.

Su administración se ha probado de diferentes maneras y los mejores resultados se han obtenido cuando se administra en combinación con algún agente quimioterapéutico (Roy and Perez, 2009).

1.3.2 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de Trastuzumab aún no están del todo esclarecidos, los mejor descritos son los siguientes.

Internalización de receptores

Este mecanismo ha sido más descrito *in vitro* que *in vivo*.

La internalización de los receptores HER-2 ocurre por un proceso de pinocitosis denominado *endocitosis mediada por receptor*. Este tipo de mecanismo internaliza

moléculas específicas pequeñas y que se encuentran en bajas concentraciones, como pueden ser hormonas, factores de crecimiento, hierro, enzimas, vitaminas, colesterol y anticuerpos. Estos últimos, son los que, en el caso de HER-2, detonan la internalización. Ante la unión específica del anticuerpo monoclonal al receptor de membrana HER-2 se forma una invaginación de la membrana celular cubierta por la proteína clatrina.

La clatrina es una proteína que media el transporte vesicular desde el aparato de Golgi o desde la membrana plasmática. COPI y COPII son otras proteínas de transporte vesicular, pero éstas, a diferencia de la clatrina, median el transporte desde el retículo endoplásmico o la cisterna de Golgi. La clatrina está constituida por tres cadenas largas y tres cortas, cada subunidad formará en la membrana plasmática, y en la cara citosólica, invaginaciones llamadas *coated pits*. Para dar lugar a una vesícula recubierta de clatrina (Alberts, 2008).

Para que la vesícula formada pueda desprenderse, la dinamina, una proteína soluble del citosol, se ensambla en la vesícula formando un anillo alrededor del cuello de la vesícula. La dinamina recluta a más proteínas en el cuello de la vesícula, las cuales le ayudan a desprender a la vesícula provocando cambios en la conformación de la membrana. Tan pronto como se desprende la vesícula de la membrana, ésta pierde su cubierta de clatrina a través de la acción de proteínas accesorias dependientes de la hidrólisis de ATP. La pérdida de la cubierta de clatrina, da lugar a la fusión con el endosoma temprano. Desde este endosoma pueden estar presentes las enzimas hidrolíticas, sin embargo éstas se encuentran inactivas en forma de zimógenos por lo que aún no pueden actuar sobre el material endocitado. Después de 5- 15 minutos el endosoma temprano pasa a un endosoma tardío, cercano al aparato de Golgi. La transición de temprano a tardío está dada por la liberación de Rab 5 y la unión de Rab 7. Dichas proteínas son las responsables de guiar a qué membrana se deberá unir la vesícula. El endosoma temprano expresa Rab 5 y detecta a las vesículas recubiertas con clatrina, el tardío expresa Rab 7 y desencadena la unión del endosoma temprano. El endosoma tardío se caracteriza por tener un pH más ácido que el temprano, este pH se mantiene a través de bombas ATPasas para hidrógeno localizadas en la membrana del endosoma. Por otro lado, en el endosoma tardío los receptores HER, pueden ser ubiquitinados a través de E3-ubiquitina ligasas, esto será una señal reconocida por proteínas adaptadoras (Eps 15, Hrs, STAM) que contribuyen a su direccionamiento al lisosoma. El endosoma tardío se

convierte en endolisosoma cuando se une a un lisosoma previamente existente. El lisosoma contiene enzimas hidrolíticas activas y, dado su pH ácido, degradarán al receptor inicialmente internalizado en una vesícula, en este caso, HER-2.

La internalización y destrucción del HER-2 reduce la disponibilidad de los receptores para su dimerización, por lo tanto impide que se activen las vías de señalización de MAPK e PI3K y con ello se interrumpe la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Alberts, 2008, Albanell et al., 2003).

Cabe mencionar que hay estudios que indican que HER-2 es un receptor resistente a la internalización en la línea celular de carcinoma mamario SKBR3, ya sea por no ser eficientemente internalizado o por ser reciclado y volver a la membrana plasmática posterior a la internalización. Dicha resistencia la atribuyen a que en la línea celular SKBR3, HER-2 se encuentra preferentemente asociado con protrusiones de la membrana plasmática, y ni la unión de heregulina ni la de Trastuzumab modifican esta localización o estimulan la internalización (Hommelgaard et al., 2004, Austin et al., 2004).

Bloqueo de la proliferación celular por arresto en G1 e inducción de apoptosis por aumento de complejos p27/Cdk2.

Las células se reproducen a través de una serie de eventos ordenados que dan lugar a la duplicación del material genético y posterior división en dos nuevas células, lo que se denomina como ciclo celular. Éste está gobernado por un conjunto de proteínas regulatorias que conforman el sistema de control del ciclo celular, que serán las responsables de identificar las condiciones en el medio intra y extra celular para que la secuencia de eventos ocurra de manera ordenada y correcta. Una alteración en el funcionamiento de estas proteínas tendrá repercusiones en el progreso del ciclo celular.

El ciclo celular se compone de cuatro fases: fase G1, fase S, fase G2 y fase M (Alberts, 2008).

Fase G1: en esta etapa la célula se enfoca en la síntesis de RNA y proteínas que serán necesarias para las siguientes etapas, como condensinas y cohesinas, las cuales tienen la función de unir a las cromátides hermanas con su homólogo. Asimismo se da la síntesis de las máquinas citoesqueléticas de actina: anillo contráctil y huso mitótico. Esta etapa es la más variable en tiempo.

Fase S: en ésta se da la duplicación del material genético, además de la síntesis de RNA y proteínas. Ocurre la formación del centrosoma (centro organizador de microtúbulos el cual se encuentra formado por una matriz de proteínas motoras y estructurales, dos centriolos y microtúbulos). Está regulada por la ciclina A y el complejo S Cdk. Tiene una duración de 6 a 8 horas.

Fase G2: Aquí el material genético ya está duplicado. Habrá más síntesis de RNA y proteínas. Los centrosomas se encuentran listos para la fase M.

Fase M: corresponde a la mitosis de la célula, proceso en el cual la célula que contiene el material genético duplicado, se dividirá en dos células iguales con dicho material dividido en dos equitativamente. La mitosis se divide a su vez en cinco etapas: Profase, prometáfase, metafase, anafase, telofase, y finalmente, ocurre la citocinesis.

El ciclo celular está regulado por el “sistema de control del ciclo celular”, éste está basado en la retroalimentación negativa dada por varias proteínas regulatorias. Su función es la de controlar que la célula tenga el material completo, el tamaño adecuado y reconocer las características favorables del medio externo para dividirse. El ciclo celular puede progresar o verse interrumpido dependiendo si las condiciones son adecuadas o no. Los llamados “puntos de control” son aquéllos en los que se evaluará si la célula debe continuar o detener su proceso. Existen tres puntos de control:

- Punto de restricción G1: evalúa si hay daños en el DNA, la maquinaria de duplicación, proteínas y el ambiente externo.

- G2/M: evalúa la alineación de los cromosomas al huso mitótico y daños en el DNA.

- Metafase- anafase: controla la correcta separación de las cromátides.

Las respuestas a los puntos de control están dadas por las cinasas y ciclinas. Las ciclinas son las responsables de fosforilar y así activar a las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk's). Las Cdk's a su vez fosforilan a otras proteínas que regularán los eventos del ciclo celular. Las cinasas tienen una concentración constante a lo largo del ciclo celular, en cambio la concentración de las ciclinas varía dependiendo la fase, con lo que modificará la activación de las cinasas (Alberts, 2008, Albanell et al., 2003, Yakes et al., 2002).

El ciclo celular no solamente necesita ser estimulado para que la célula progrese de una fase a otra, sino que también es fundamental la regulación de la inhibición del mismo, la cual está dada por:

-Wee 1: es una cinasa que inactiva por medio de la fosforilación a otras cinasas. Por lo tanto inhibe a las Cdk's.

-Cdc 25: desfosforila cinasas, por lo tanto, retira el efecto de Wee 1 y activa Cdk's.

Ckl's: dentro de estas proteínas inhibidoras, se encuentran la p27, p16 y p21.

-p27: suprime la actividad de G1/S- Cdk y S-Cdk durante G1. Ayuda a la célula retirarse del ciclo celular.

-p16: suprime la actividad de G1/S- Cdk y S-Cdk ante un daño en el DNA.

-p21: suprime la actividad de G1- Cdk en G1 (suele estar inactiva en cáncer). (Alberts, 2008).

Como se describió anteriormente, cuando hay una sobre expresión de receptores HER-2 que se heterodimerizan, se activa la vía de PI3K, y dentro de esta cascada de señalización una de las proteínas activadas es la Akt. Ésta, además de inhibir la apoptosis celular, inhibe a la proteína p27, ya sea de manera directa o inhibiendo su transcripción por medio de la fosforilación de factores de transcripción para p27.

La p27 es una proteína inhibidora de cinasas dependientes de ciclinas (CKI), juega un papel fundamental en la contención y regulación del ciclo celular. Su función principal es la de suprimir la actividad de G1/S Cdk y S-Cdk en la fase G1 del ciclo celular, impidiendo que la célula llegue al punto de restricción y entre a fase S para duplicar su material genético. Por lo tanto, si Akt está activa, bloquea a un inhibidor del ciclo celular, haciendo que la célula continúe su proceso de división.

Uno de los mecanismos en los que radica la eficacia del anticuerpo monoclonal, es justamente el bloqueo de esta vía, impidiendo el incremento de Akt. Al no haber Akt, la p27 no es inhibida y puede unirse libremente a la Cdk2, aumentando así el número de complejos p27/Cdk2, con lo que ejerce su efecto supresor del ciclo celular. La p27 mantiene a la célula retenida en la fase G1 y por lo tanto, reduce al número de células en fase S (Alberts, 2008, Albanell et al., 2003, Yakes et al., 2002).

Inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Un anticuerpo monoclonal puede detonar la lisis celular de las células tumorales mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Las células efectoras con receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (FcγRIIIA o CD16), lisan las células, en este caso las tumorales, que tienen unidos anticuerpos al reconocer la porción Fc de los mismos.

Las células citotóxicas naturales o natural killer (NK) representan una subpoblación de linfocitos que se localizan en la sangre y en los tejidos linfoides, especialmente el bazo, además de encontrarse en gran cantidad en el hígado. Derivan de la médula ósea, se caracterizan por contener en su interior numerosos gránulos citoplasmáticos. Sólo después de activarse, adquieren la apariencia granulosa. Los gránulos de las células NK contienen perforinas, granzimas, factor de necrosis tumoral tipo b (TNF-β) y proteoglicanos (condroitín sulfato A).

Si se considera su fenotipo de superficie y el linaje, las células NK no son células T ni B. Éstas no sufren maduración en el timo y no expresan moléculas CD3, marcador específico de células T.

Las células NK expresan un receptor de baja afinidad para la porción Fc de la IgG, llamado FcγRIIIA (CD16). Este receptor es el responsable del reconocimiento de la porción Fc de IgG, en este caso del anticuerpo monoclonal que se encontrará unido a las células tumorales con expresión de HER-2. La acción efectora de las células NK detonada por la unión de su receptor CD16 a la porción Fc de la IgG es la denominada citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, del inglés antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) (Nelson et al., 2001, Clynes et al., 2000).

La unión del receptor CD16 al anticuerpo monoclonal, activa a la célula NK, haciendo que sus gránulos se desplacen hacia la zona de la membrana que está en mayor contacto con la célula tumoral a través de la IgG. Posteriormente se libera su contenido hacia el espacio extracelular entre las dos células.

Las NK, a través de sus gránulos podrán detonar la lisis de la célula tumoral por medio de diferentes mecanismos. El componente más importante de los gránulos son las perforinas. La interacción de estas proteínas con la membrana de la célula tumoral se

establece a través de los fosfolípidos que contengan fosfatidilcolina. El resultado de esto es la formación de un amplio canal en la membrana (poro), que es por sí mismo suficiente para la muerte celular, llevando a las células blanco a necrosis por osmólisis. Además, este poro provee una puerta de entrada a otras moléculas efectoras como las granzimas. Las células NK no sólo detonan muerte celular por necrosis sino que otro mecanismo es la activación de la apoptosis. Este otro mecanismo lítico es posible gracias a las granzimas, particularmente el subtipo *granzima B*. Estas proteínas se encuentran dentro de los gránulos de las NK y son capaces de inducir la apoptosis a través de la activación de las caspasas, especialmente la caspasa 3 (Clynes et al., 2000, Nelson et al., 2001).

Se ha encontrado que la actividad de Trastuzumab evaluada en modelos animales depende de la unión de linfocitos expresando receptores Fc, indicando a la ADCC como el mecanismo de acción más importante del anticuerpo (Menard et al., 2004).

Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP)

Se le había puesto poca atención a este mecanismo, pero recientemente la ADCP ha sido reconocida como otro de los mecanismos de acción más relevantes de Trastuzumab para matar células tumorales. La ADCP y la ADCC tienen efectos sinérgicos. Los macrófagos median la ADCP y la muerte de células tumorales en presencia del anticuerpo monoclonal. El aumento en la infiltración de macrófagos en tejidos tumorales, ha sido asociado a una mayor eficacia de Trastuzumab en modelos de xenotrasplante murinos. La ADCP está mediada por la unión del FcγRI (CD64) de los macrófagos a la porción Fc del anticuerpo unido a células tumorales (Shi et al., 2015).

Bloqueo de metástasis y angiogénesis

A través de estudios con ratones inmunosuprimidos, a los cuales se les trasplantaron células de carcinoma mamario con sobre expresión de HER-2, el tratamiento con trastuzumab ha mostrado reducción tumoral del 30%, acompañado de una disminución en los vasos sanguíneos, con lo que se concluyó que el trastuzumab tiene otros mecanismos *in vivo* además de la ADCC (Izumi et al., 2002).

El anticuerpo monoclonal disminuye la irrigación tumoral, por un lado, bloqueando las vías de señalización de HER-2 que promueven la expresión de factores proangiogénicos como VEGF y TGF α y por el otro, estimulando factores antiangiogénicos como

trombospondina- 1 (TSP-1). El tratamiento con Trastuzumab disminuye significativamente el diámetro y volumen de los vasos sanguíneos tumorales y la permeabilidad vascular. Disminuir la irrigación tumoral reduce el poder metastásico del tumor.

El entendimiento de los mecanismos de acción del trastuzumab es fundamental para diseñar un protocolo de tratamiento adecuado en pacientes con carcinoma mamario. Dado que el mecanismo más importante es la ADCC, la combinación de la administración del anticuerpo con quimioterapia con efectos inmunosupresores, requiere de la administración en tiempos óptimos para mantener los efectos de las células NK (Menard et al., 2004).

1.3.3 Resistencia a Trastuzumab

Se ha demostrado la generación de diferentes mecanismos de resistencia al Trastuzumab, los principales son: (Roy and Perez, 2009)

- Expresión de la forma truncada altamente activa de HER-2 (p95 HER-2): carece del dominio extracelular de unión a trastuzumab
- Enmascaramiento del dominio extracelular por mucina (MUC-4)
- Transactivación de HER-2 con otros miembros de la familia EGFR
- Señalización por IGFR
- Incremento de la vía PI3K/Akt
- Modulación de la actividad de p27 y CDK2

1.4 Respuesta inmune en cáncer

1.4.1 Antecedentes y generalidades

El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto inicialmente por Thomas y Burnet en 1957 con la teoría de la “vigilancia inmunológica”. Ésta postula que en el organismo continuamente se están generando células malignas, pero el sistema inmune tiene la capacidad de identificarlas y destruirlas rápidamente (Barrera-Rodriguez et al., 1995).

El sistema inmune juega tres papeles fundamentales en la prevención de tumores. El primero, protege al hospedero del desarrollo de tumores inducidos por infección viral, a través de la eliminación o supresión del virus. Segundo, la pronta eliminación de

patógenos y resolución de procesos inflamatorios, con esto evita un microambiente favorecedor para el desarrollo tumoral. Tercero, el sistema inmune puede identificar de manera específica y eliminar células malignas cuando éstas expresan antígenos tumorales específicos o moléculas inducidas por estrés celular. Éste tercer punto corresponde a la vigilancia inmunológica (en inglés, *immune surveillance*) y se refiere a la capacidad del sistema inmune de identificar células cancerosas o precancerosas y eliminarlas antes de que causen daño (Swann and Smyth, 2007).

A pesar de la vigilancia inmunológica, los tumores se pueden desarrollar en organismos con un sistema inmune competente, es por esto que surge el concepto de “inmunoedición” (en inglés, *immunoediting*), el cual abarca una visión más amplia del papel del sistema inmune en el desarrollo tumoral. La inmunoedición se divide en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. La fase de eliminación corresponde a lo que propone la vigilancia inmunológica, donde el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar a células tumorales. La fase de equilibrio se refiere a un estado temporal que se puede desarrollar entre el sistema inmune y el tumor, durante esta etapa las células tumorales acumulan más mutaciones con las cuales modulan la expresión de antígenos específicos de tumor y de antígenos inducidos por estrés. El sistema inmune ejerce sobre las células tumorales un proceso de presión selectiva y elimina a las células tumorales susceptibles. Este mecanismo controla temporalmente la progresión tumoral, pero si el sistema inmune no logra eliminar la totalidad de las células, el proceso habrá resultado en la selección de las variantes de células tumorales que son capaces de resistir, evadir o suprimir la respuesta inmune antitumoral, dando lugar a la fase de escape. Durante ésta el sistema inmune ya no es capaz de controlar el crecimiento tumoral, teniendo como resultado un crecimiento progresivo (Swann and Smyth, 2007).

La inmunoedición ha sido comprobada de varias maneras:

- En ratones genéticamente modificados deficientes en varios componentes del sistema inmune, los tumores aparecen con mayor frecuencia y además presentan una proliferación más rápida. Especialmente los ratones deficientes en CD8⁺, CD4⁺, Th1 o células NK, tienen incrementos en la incidencia de tumores, demostrando que tanto la inmunidad innata como la adaptativa juegan un papel importante para evitar la aparición de éstos (Hanahan and Weinberg, 2011).

- Los tumores aparecen más frecuentemente en el periodo neonatal y en edades avanzadas cuando el sistema inmune funciona con menos efectividad.
- Hay mayor incidencia de tumores en individuos inmunodeprimidos. La inmunosupresión causada por inmunodeficiencias y la terapia inmunosupresora para prevenir rechazo de órganos en individuos transplantados, están asociados con una mayor incidencia de tumores. Los pacientes con terapia inmunosupresora por trasplante, tienen una incidencia de cáncer de 3 a 100 veces incrementada sobre todo en cáncer de origen viral, aunque también los tumores sólidos de origen no viral se ven incrementados.
- Ocurrencia de regresiones espontáneas en tumores malignos.
- Mejor o peor pronóstico dependiendo del infiltrado de células inmunitarias que tenga el tumor. El infiltrado de células T, NK o NKT ha sido asociado con un mejor pronóstico.
- Síndrome autoinmune paraneoplásico: algunos pacientes con tumores presentan síntomas causados por la presencia del tumor pero que no son resultado del crecimiento local de éste, sino que ocurren por la activación de una respuesta inmune contra antígenos de células tumorales que tienen reacción cruzada con antígenos neurológicos. Esto demuestra una respuesta humoral. (Swann and Smyth, 2007, Barrera-Rodriguez et al., 1995)

Cada vez está más claro que los tumores no son únicamente un grupo de células cancerosas en proliferación, sino tejidos complejos conformados por múltiples tipos celulares que participan interactuando entre ellas. El estroma asociado al tumor es un participante activo de la carcinogénesis, incluso contribuye al desarrollo de las capacidades tumorales como invasión y metástasis.

En algunos casos las células del sistema inmune constituyen otro componente prominente de la respuesta al cáncer, pero su participación no está del todo entendida. Mientras que los infiltrados linfocitarios en etapas tempranas de la neoplasia están asociadas a menor desarrollo de metástasis y aumento de la supervivencia de los pacientes, la inflamación crónica incrementa el riesgo de transformación maligna y la promoción del desarrollo tumoral (Dranoff, 2004). Es por esto que la biología de los tumores ya no puede ser estudiada como un conjunto de células cancerosas, sino deben estudiarse bajo todas las contribuciones del microambiente tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011).

Hay dos mecanismos principales involucrados en el reconocimiento de las células cancerosas, de manera general se pueden dividir en mecanismos de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa.

1.4.2 Inmunidad innata contra tumores

La inmunidad innata utiliza receptores reconocedores de patrones (*pattern- recognition receptors*: PRRs) y otras moléculas de superficie para detectar directamente células tumorales. Los cánceres frecuentemente expresan familias de genes relacionados a estrés, tales como MICA y MICB, los cuales funcionan como ligandos para los receptores NKG2D, expresados en células NK, linfocitos citotóxicos y algunos fagocitos. Las células NK, además, monitorean la pérdida de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC clase I) en la superficie de las células tumorales, lo que normalmente ocurre durante la carcinogénesis. Los macrófagos participan en la fagocitosis de elementos tumorales y en la presentación antigénica a LT CD4+ en MHC clase II, además producen Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Las células dendríticas utilizan su CD36 para fagocitar a células tumorales apoptóticas, procesan los restos celulares fagocitados para presentarlos en el MHC (Dranoff, 2004).

1.4.3 Inmunidad adaptativa contra tumores

Las células tumorales normalmente pierden la expresión de moléculas coestimuladoras como B7, necesarias para activar respuestas de los linfocitos T. En contraste, las células dendríticas, aumentan la expresión de B7-1 y B7-2 y migran al linfonodo regional más cercano para estimular a linfocitos específicos contra tumor. Por esta vía se generan linfocitos T CD4+ y CD8+ que reaccionan con péptidos tumorales restringidos por el MHC. Los CD4+ estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos contra productos génicos asociados a tumores. Las células NK parecen ser las células efectoras más importantes en la respuesta inmune efectora a células cancerosas, a través del mecanismo de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC) (Dranoff, 2004).

1.4.4 Mecanismos de escape

A pesar de que el sistema inmune puede responder con mecanismos innatos y adaptativos en contra de las células cancerosas, el desarrollo de cáncer evidente clínicamente indica que en ocasiones estos mecanismos no son suficientes para limitar la progresión celular. Las células tumorales pueden lograr escapar del reconocimiento y

eliminación del sistema inmune (Dranoff, 2004). Los mecanismos que dan lugar a este fallo en la inmunidad no son del todo claros, pero ya se han descrito varios tanto en animales como en humanos:

- Pérdida o disminución de la expresión de MHC clase I.
 - Pérdida o disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras.
 - Liberación de factores inmunosupresores como el TGF β .
 - Mutaciones en los genes del MHC lo cual produce alteraciones en la estructura del complejo MHC-péptido.
 - Modulación antigénica: a la célula tumoral se le pueden unir anticuerpos que no fijan complemento lo que puede producir endocitosis del complejo antígeno-anticuerpo perdiéndose su expresión en la superficie celular. Además, la presencia de estos anticuerpos impiden la unión de otros que sí fijan complemento.
 - Enmascaramiento: las células tumorales pueden recubrirse con moléculas del hospedero, como glucocálix.
 - Deficiencia en el procesamiento antigénico por parte de la célula tumoral.
 - Resistencia de la célula tumoral a los mecanismos antitumorales del hospedero.
 - Rápida proliferación celular que supera la capacidad de respuesta del sistema inmune. En algunos casos el sistema inmune es incapaz de responder, pero en otros casos, aun sí lo hace, eventualmente es superado y evadido.
 - Desarrollo de tumores en sitios privilegiados. Los tumores desarrollados en sistema nervioso central y ojo, por ejemplo, no están expuestos a todos los mecanismos efectores del sistema inmune.
 - Expresión de moléculas inhibitorias de LT tales como B7-H1, HLA-G y HLA-E por parte de las células tumorales.
 - Presencia de Tregs CD4⁺ y CD25⁺ que suprimen la inmunidad antitumoral.
 - Expresión de factores supresores por parte de los tumores, como TGF β , VEGF, IL-10 y gangliósidos.
 - Resistencia tumoral a vías citotóxicas.
 - Sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas como FLIP y BCL-X_i.
- (Swann and Smyth, 2007, Alexánder, 2003)

El sistema inmune juega un papel paradójico en la respuesta a tumores, por un lado puede desarrollar una respuesta tan eficiente que logre la remisión tumoral, pero también

es posible no sólo que sea evadido, sino que favorezca la proliferación del cáncer. Esto dependerá de la combinación de factores que respondan a la presencia de las células tumorales. A continuación se describen las diferentes respuestas del sistema inmune que pueden promover el desarrollo del cáncer.

1.4.5 Inflamación crónica y desarrollo del cáncer

Cuando la homeostasis de algún tejido se perturba de manera crónica, la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa se puede ver afectada; la acción del sistema inmune podrá resultar en un excesiva remodelación de tejido, pérdida de su arquitectura por destrucción, alteraciones en el DNA provocadas por estrés oxidativo y en algunos casos, incremento en el riesgo de desarrollo de cáncer.

Desde hace aproximadamente un siglo se sabe que existe una asociación entre las células del sistema inmune y el cáncer. Inicialmente se pensaba que los infiltrados de leucocitos dentro y alrededor de las neoplasias representaban un intento del hospedero por eliminar las células neoplásicas y en efecto, la infiltración de células NK en carcinoma gástrico y colorectal, por ejemplo, está asociado a un pronóstico favorable. En contraste, cuando una neoplasia contiene infiltrados de otras células de la inmunidad innata, como macrófagos en cáncer de mama o mastocitos en adenocarcinoma pulmonar y melanoma, está asociado a un pronóstico clínico desfavorable. Normalmente las células tumorales polarizan al sistema inmune hacia una respuesta inflamatoria crónica protumorigénica, en vez de generar respuestas inmunes agudas antitumorales, ésta es otra de las explicaciones a por qué las células tumorales escapan a la vigilancia inmunológica.

Durante la inflamación crónica también participa la inmunidad adaptativa que favorece el desarrollo del cáncer. La inmunidad adaptativa puede activar a la inmunidad innata en los tejidos afectados. Cuando los anticuerpos se depositan en un tejido pueden detonar la activación de células innatas que cuentan con receptor Fc o por la activación del complemento por la vía clásica. Con lo que pueden mantener la inflamación crónica y así, el desarrollo del cáncer. Varios estudios demuestran que la presencia de autoanticuerpos (dirigidos a células tumorales) en suero, correlacionan con un peor pronóstico, por lo que los linfocitos B también están implicados en el desarrollo del cáncer (de Visser et al., 2006, Hanahan and Weinberg, 2011).

1.4.6 Inmunidad innata y desarrollo del cáncer

Las células innatas regulan el proceso del cáncer, sobre todo, cuando hay inflamación crónica. A pesar de que quedan muchas dudas al respecto, varios de los mecanismos implicados en este proceso están empezando a ser entendidos. Debido a su enorme capacidad de producir gran variedad de citocinas, metaloproteasas, histamina y otros mediadores con actividad biológica, las células innatas activadas crónicamente son moduladoras clave de la sobrevivencia celular (tanto proliferación como muerte) y reguladoras del metabolismo. Por lo tanto, varios procesos fisiológicos que son necesarios para el desarrollo tumoral, tales como el aumento de la sobrevivencia celular, remodelación tisular, angiogénesis y supresión de las respuestas inmunes adaptativas, están reguladas por infiltrados leucocitarios en ambientes neoplásicos. Existe una correlación positiva entre el número de células de la inmunidad innata (macrófagos, mastocitos y granulocitos) infiltrados en neoplasias y el número de vasos sanguíneos. Las metaloproteasas de matriz (MMPs) en tumores malignos humanos correlacionan con un mal pronóstico, la mayor fuente de estas enzimas proviene de células estromales activas como fibroblastos, células endoteliales y particularmente, células innatas del sistema inmune. Varias MMPs tienen la propiedad de estimular la angiogénesis a través de la movilización de VEGF.

La inmunidad innata activada de manera crónica, indirectamente contribuye al desarrollo del cáncer a través de la supresión de la respuesta inmune adaptativa antitumoral, dando lugar al escape tumoral. Algunas células innatas como las células mieloides supresoras inducen disfunción de LT por contacto directo célula-célula y a través de la producción de mediadores inmunosupresores. Además las lesiones malignas atraen a células Tregs, que suprimen las funciones de los LT citotóxicos (Hanahan and Weinberg, 2011, de Visser et al., 2006).

1.4.7 Inmunidad adaptativa y desarrollo del cáncer

El papel que juegan las células de la inmunidad adaptativa en el desarrollo del cáncer sigue siendo muy debatible. Existen varios estudios epidemiológicos que muestran un incremento significativo en enfermos de SIDA o pacientes con trasplante de órganos que reciben terapia inmunosupresora, de la incidencia de diferentes tipos de cáncer, sobre todo de origen viral, como sarcoma de Kaposi (herpes-8 humano) y linfoma no-Hodgkin (virus de Epstein-Barr). No sorprende que la supresión de la inmunidad adaptativa

incremente la incidencia de tumores de origen viral, lo que es difícil de explicar es por qué esta inmunosupresión correlaciona con una disminución en el riesgo relativo de tumores no virales, por ejemplo, pacientes con SIDA tienen 50% menos riesgo relativo de cáncer de mama o de próstata (de Visser et al., 2006).

Los linfocitos B pueden contribuir a la respuesta inmune antitumoral a través de la síntesis de anticuerpos antígeno-específico, de hecho cuando se activan de manera aguda, pueden participar en la regresión espontánea de tumores por fagocitosis o destrucción citotóxica. Sin embargo, como se describió anteriormente, cuando se activan de manera crónica los LB, potencian el desarrollo del carcinoma (DeNardo and Coussens, 2007).

1.4.8 Complemento y desarrollo del cáncer

La fijación del complemento por la vía alterna es un componente fundamental de la inmunidad innata, contiene algunas de las moléculas proinflamatorias más potentes en el organismo, las más notables son C3a y C5a. Existe una gran cantidad de estudios que analizan la relación entre la inflamación y el cáncer, sin embargo, la mayoría deja de lado el papel del complemento en el desarrollo del cáncer. Recientemente se describió que C3, C4 y C5a promueven el crecimiento tumoral (Pio et al., 2013).

El complemento promueve la oncogénesis. Las anafilatoxinas C3a y C5a tienen propiedades proliferativas pues participan en vías de transducción de señales. Tanto el receptor de C3a y de C5a son acoplados a proteínas G, cuando se unen a su respectivo ligando activan a miembros de la vía MAPK, vía implicada en proliferación celular comúnmente sobre activada en cáncer.

El complejo de ataque a membrana (MAC) activa el ciclo celular y vías oncogénicas. El MAC está conformado por las moléculas C5b, C6, C7, C8 y C9 del complemento, éste forma poros en la membrana celular permitiendo el desequilibrio osmótico y con esto, la lisis celular. La visión clásica del efecto del MAC es que éste representa el evento final de la vía del complemento. Sin embargo, la eficiencia de la lisis celular depende del número de MACs formados en la membrana y de la capacidad de la célula para defenderse y reparar el daño. Varias células tienen mecanismos para actuar en contra del MAC, incluyendo el uso de bombas de iones para evitar el desequilibrio osmótico, proteasas y cinasas que inactivan al MAC e inhibidores acoplados a membrana como CD59. Es importante recalcar que las dosis subléxicas de MAC inducen diferentes efectos,

incluyendo la activación del ciclo celular y proliferación. La presencia de MACs en la membrana celular incrementa la síntesis de DNA y la proliferación celular de manera dosis dependiente, esto se debe a que induce la activación de varias vías implicadas en carcinogénesis, como MAPK, ERKs, JNKs, PI3K y Ras (Macor and Tedesco, 2007).

Las proteínas del complemento regulan a la alza factores de crecimiento y citocinas que favorecen la oncogénesis. Las células endoteliales, en respuesta a la formación de MACs, liberan factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Ambos son mitógenos que estimulan el ciclo celular y la angiogénesis. También se ha descrito que las proteínas del complemento inducen la producción de TGF β , el cual puede tanto inhibir como promover la neoplasia (Pio et al., 2013).

Las proteínas del complemento tienen efectos prosobrevivencia y antiapoptóticos. La molécula C5a disminuye la apoptosis a través de la inhibición de la caspasa 3 y de la regulación a la baja de algunas vías de apoptosis mediada por receptor. También se han descrito propiedades antiapoptóticas de C3a ya que ha demostrado tener, incluso, efecto neuroprotector. Las dosis sublétricas de MAC inhiben proteínas proapoptóticas, incluyendo a las caspasas 3 y 8, BAD y BID, TNF α y FasL, al tiempo que incrementan la síntesis de moléculas antiapoptóticas como bcl-2 y IGF-I (Pio et al., 2013).

El complemento promueve la angiogénesis. En humanos el receptor para la molécula C1a está involucrado en angiogénesis y en migración celular. Se ha descrito también que C3a y C5a estimulan la secreción de VEGF.

Las proteínas del complemento estimulan tanto la invasión como la migración celular. Éstas en su forma activa se encuentran dispersas abundantemente en la matriz extracelular alrededor del cáncer. Durante la formación de la neoplasia ocurre reorganización de las conexiones intercelulares, principalmente de las uniones célula-célula a través de la familia de cadherinas. La unión de C3a a su receptor induce transformación epitelio- mesenquimal a través de la disminución de la expresión de cadherina-E. Además C5 induce la expresión de IGF, que ha mostrado tener la habilidad de regular a la baja estas proteínas de adhesión.

Varias proteínas del complemento tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular. Por ejemplo, C1s puede degradar colágeno en cartílago y activar a metaloproteasas, fomentando así la metástasis (Macor and Tedesco, 2007).

1.4.9 Respuesta inmune en la progresión del cáncer de mama

Linfocitos B

Durante el desarrollo del cáncer de mama se pueden encontrar, en tejidos linfoides secundarios y en estroma asociado al tumor, linfocitos B (LB) maduros. Los linfonodos centinelas de las pacientes con cáncer de mama contienen, en comparación con las mujeres sanas, poblaciones en proliferación y con maduración de la afinidad (IgG⁺) de LB. La presencia y/o maduración de las poblaciones de LB en linfonodos centinelas correlaciona con el aumento del estadio de la enfermedad. Aproximadamente el 20% de los cánceres de mama invasivos contienen un gran número de LB, éstos predominan en la etapa temprana de progresión.

Hay estudios que describen cómo los LB regulan el desarrollo del cáncer mamario. Aproximadamente 50% de las pacientes con cáncer de mama tienen inmunoglobulinas circulantes que reaccionan específicamente contra antígenos derivados de tumor. Los autoanticuerpos contra HER-2 están presentes en el 20% de las pacientes HER-2⁺. Haciéndolo el autoantígeno más común en cáncer de mama. Paradójicamente, la presencia de autoanticuerpos en suero correlaciona con menor supervivencia de las pacientes, indicando tal vez que las inmunoglobulinas resultantes de la activación crónica de LB promueve la progresión de la enfermedad. A pesar de que 50% de las pacientes tiene anticuerpos antitumorales, son muy pocos los reportes de regresión espontánea de tumor en ausencia de terapia.

Linfocitos T

A diferencia de los LB, que predominan en etapas tempranas, los linfocitos T (LT) son más frecuentes en estados avanzados de carcinoma ductal in situ (DCIS) y en carcinomas invasivos. En tumores con rápida proliferación, la presencia de LT en el sitio del tumor (determinados en estudio histopatológico), es un indicador de buen pronóstico, sin embargo, la composición del infiltrado de células T varía ampliamente y puede afectar la proliferación del tumor.

No está del todo claro si la presencia de LT CD8⁺ por sí sola provee información sobre el pronóstico clínico. Se ha observado que la presencia de un alto porcentaje de LT CD4⁺ en el sitio del tumor primario, correlaciona positivamente con progresión de la enfermedad,

incluyendo generación de metástasis y aumento de tamaño del tumor primario. Al parecer lo más importante es la proporción de CD4⁺ a CD8⁺, cuando ésta es mayor a uno correlaciona positivamente con metástasis a linfonodos y menor sobrevida del paciente.

Los CD4⁺ pueden estar implicados en el avance del cáncer dependiendo cómo se polarice su respuesta: como Th1 o Th2. Cuando la respuesta es Th1, éstos secretan IFN γ , TNF α e IL-2. Estas citocinas promueven la acción citotóxica de los LT CD8⁺ y aumentan el procesamiento de antígenos para ser presentados en MHC clase I y II. Además, el IFN γ aumenta la actividad citotóxica de macrófagos. En contraste, una respuesta CD4⁺ polarizada hacia Th2 da como resultado la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, e IL-13, esto induce la anergia de las células T, pérdida de la citotoxicidad mediada por células T y estimulación de la inmunidad humoral. Por lo tanto, se piensa que las respuestas Th1 son benéficas para la inmunidad antitumoral, mientras que las Th2, generan respuestas a favor del cáncer (DeNardo and Coussens, 2007).

Linfocitos T reguladores

Las neoplasias pueden promover la expansión de células T reguladoras (Treg). Las células Treg se caracterizan por la expresión de CD4, CD25 y FOXP3, su función consiste en proteger a los tejidos de autoinmunidad suprimiendo a células T autorreactivas. En tejidos sanos conforman del 5 al 10% de la población total de linfocitos T.

En cáncer de mama el porcentaje de células Treg se evalúa con el marcador FOXP3, y éste incrementa en paralelo con el estadio de la enfermedad, siendo un mal pronóstico clínico.

Las Treg's tienen la capacidad de inhibir, por contacto célula-célula, a LT CD8⁺, células dendríticas, células NK y LB, con lo que favorecen el desarrollo tumoral. El mecanismo por el cual las neoplasias estimulan la proliferación y diferenciación de Treg's aún no está claro, pero se ha descrito que la producción de prostaglandina E2 por parte de las células tumorales, actúa como un agente quimiotáctico y promotor de la diferenciación para células Treg (DeNardo and Coussens, 2007).

1.5 Pruebas preclínicas para anticuerpos monoclonales

Los estudios preclínicos de un medicamento son aquellos pruebas *in vitro* e *in vivo* que se realizan previamente a la evaluación del medicamento en seres humanos. Los estudios

de seguridad buscan predecir si un medicamento puede ser dañino en humanos y prevenir dicha situación. Cabe subrayar que el objetivo de los estudios de seguridad, no es establecer el beneficio terapéutico del medicamento, sino conocer y prevenir posibles daños ocasionados por su administración; la seguridad se evalúa por medio de estudios de toxicidad aguda y toxicidad a dosis repetidas. Los estudios de eficacia, en cambio, tienen como objetivo conocer el efecto terapéutico de un medicamento en una enfermedad en específico. Estas pruebas se realizan en modelos de experimentación que imiten, lo más posible, lo que ocurriría en el organismo humano (Pugsley et al., 2008).

Los estudios preclínicos de cualquier medicamento son fundamentales, ya que en éstos se sustenta la toma de decisiones para los estudios clínicos realizados en personas. A pesar de que no todos los resultados obtenidos en modelos animales, son transpolables al ser humano, hay muchos casos documentados que demuestran la aplicación exitosa de los resultados preclínicos a los estudios clínicos (Tabrizi and Roskos, 2007).

Los anticuerpos monoclonales, como todos los medicamentos, requieren estudios preclínicos. Aun cuando se sabe que normalmente son seguros y bien tolerados, pueden resultar tóxicos por diferentes mecanismos.

Uno de los mecanismos de toxicidad está determinado por las funciones efectoras del anticuerpo monoclonal. La ADCC es uno de las principales vías de acción de los anticuerpos, este efecto los hace efectivos, pero también puede causar toxicidad. Tal es el caso de Rituximab, un anticuerpo monoclonal indicado en linfoma de células B no Hodgkin y artritis reumatoide, con el que se han reportado reacciones severas a la infusión, atribuidas a la ADCC detonada por el medicamento, debido a que el blanco del anticuerpo es la molécula CD20, presente en los LB normales. (Genetech., 2013).

Otro mecanismo de toxicidad ocurre cuando tejidos sanos expresan el antígeno blanco del anticuerpo monoclonal, en estos casos, no se puede evitar que en anticuerpo se una tanto al tejido de interés como al tejido sano, pudiendo provocar daños; tal es el caso de la cardiotoxicidad por el tratamiento con trastuzumab, atribuida a la expresión del HER-2 en músculo cardíaco (Roche, 2010, Tabrizi and Roskos, 2007).

La hipersensibilidad es otro de los posibles efectos tóxicos de los anticuerpos monoclonales, normalmente está asociada a inmunogenicidad, lo cual ocurre cuando el anticuerpo contiene gran cantidad de proteínas xenogénicas. Esto era un problema

común con el uso de anticuerpos murinos, pero se ha evitado con el desarrollo de anticuerpos quiméricos o humanizados (Tabrizi and Roskos, 2007).

2. ESTUDIOS DE SEGURIDAD: TOXICIDAD AGUDA

2.1 Introducción

Los estudios de seguridad están encaminados a disminuir el riesgo de toxicidad en el humano y generar información de utilidad para los ensayos clínicos.

La toxicidad aguda es la que se produce después de la administración de una dosis única (o múltiples dosis) en un periodo que no exceda 24 horas, y empleando 2 especies roedoras exogámicas para conservar la variabilidad genética al máximo a fin de emular de la mejor forma posible lo que pueda ocurrir en la población humana y utilizando la vía de administración de uso prevista (FDA, 2003, CDER, 1996). No obstante, según cita la NOM-EM-001-SSA1-2012: “en ciertos casos justificados, el uso de una especie puede ser suficiente (cuando sólo pueda ser identificada una especie relevante o cuando la actividad biológica del biotecnológico esté bien entendida)”. Para un estudio de biocomparabilidad, la utilidad de este tipo de ensayos es cuestionable si la especie en la que se efectúa no es una especie relevante, por lo que se considera suficiente el uso de una sola especie de forma comparativa con el medicamento de referencia. Cabe señalar que una prueba de este tipo proporciona información del posible efecto adverso del medicamento (el fármaco y su formulación) pero no evalúa el daño que el anticuerpo monoclonal pudiera ocasionar al unirse a su célula blanco. Mientras que en una especie relevante, en la que la molécula blanco sea conservada o con alta homología a la del humano, sí podría medirse el efecto tóxico que el anticuerpo puede provocar al unirse a su receptor, más allá del mecanismo funcional (eficacia) que se espera de esta unión.

El modelo animal utilizado en este estudio no es una especie relevante, sin embargo, debido a que los estudios de toxicidad subcrónica se realizaron en monos (*Macaca mulatta*), que es la única especie no humana relevante, se considera que incluir una especie roedora convencional y exogámica es suficiente para la toxicidad aguda (Chapman et al., 2007).

2.2 Objetivo

Comparar si el medicamento de prueba y el medicamento de referencia causan una respuesta semejante en un ensayo de toxicidad aguda en ratón.

2.3 Metodología

2.3.1 Producto de prueba:

Se utilizaron cuatro productos de prueba: medicamento de referencia (Trastuzumab) y frasco ampula con diluyente, medicamento de prueba, vehículo del medicamento de prueba (fue utilizado como placebo) y agua Inyectable.

Se emplearon ratones Hsd: ICR "S.P.F." (*Specific Pathogen Free*) adultos jóvenes de ambos sexos, las hembras fueron nulíparas y no gestantes. Al comienzo del estudio, el peso promedio de los animales fue 27.1 g para machos y 24.9 g para hembras. Las variaciones de peso de los animales no excedieron ± 5 g del promedio de peso de cada sexo. Los animales fueron obtenidos del Centro UNAM-Harlan de Producción de Animales de Laboratorio (Barrera 650) con sede en la Planta Baja de la Unidad de Experimentación Animal (UNIPREC) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2.3.2 Condiciones de alojamiento y alimentación.

Los animales fueron alojados bajo condiciones ambientales controladas en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM (Gracia., 1996), y en conformidad con la NOM-062-ZOO-1999; los ciclos de luz oscuridad fueron de 12/12 h. Se les proporcionó alimento Harlan Teklad 2018S para ratón/rata y agua obtenida del Centro UNAM-Harlan, la cual está purificada, filtrada hasta 0.22 μm y proporcionada *ad libitum*. Las jaulas para su alojamiento fueron de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 18.415 x 29.21 x 12.7 cm, (5 ratones/caja). La cama que se utilizó fue Pine Shaving Bedding Harlan Teklad Diets. Los ratones para el estudio fueron aleatorizados otorgándoles una numeración temporal con un marcador indeleble en la cola y empleando una función de números aleatorios con una calculadora de funciones científicas para formar los grupos, una vez colocados en sus jaulas se identificaron de forma permanente por medio de perforaciones en las orejas con números consecutivos del 1 al 60 y fueron pesados en una balanza Ohaus® (día 0). Permanecieron en sus jaulas por un periodo de 2-3 días para aclimatarlos a las condiciones del cuarto de experimentación, durante este periodo fueron observados para evaluar su estado de salud. El trabajo se efectuó en conformidad con la NOM-062-ZOO-1999 y con la aprobación del Comité Institucional para

el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM (OFICIO/FQ/CICUAL/037/12).

2.3.3 Diseño Experimental

Se utilizó el siguiente esquema de dosis para el medicamento de prueba y el medicamento de referencia en ambos sexos (cinco hembras y cinco machos por grupo de estudio), usando una sola dosis, por vía intravenosa (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 *Esquema de dosis*

Dosis: mg/kg PC por producto	Rango de volumen* administrado en mL	Número de hembras/grupo	Número de machos/grupo
21	0.02-0.03	5	5
63	0.07-0.09	5	5
105	0.11-0.14	5	5
157.5	0.18-0.22	5	5
210	0.27-0.28	5	5
Placebo	0.3	5	5
Agua inyectable	0.2-0.3	5	5

Resumen de las dosis y volúmenes administrados, del medicamento de prueba y de referencia, a los diferentes grupos de hembras y machos.

*El volumen se ajustó de forma individual a cada animal, según su peso corporal.

El día de la administración se pesaron los animales y se realizaron los cálculos en el programa Excel para administrar las dosis de manera individual (dosis/peso/animal). El volumen administrado varió dependiendo del peso de cada animal. Éste quedó en un rango de entre 0.02 y 0.3 mL, según se muestra en el **cuadro 2.1**. La administración del producto se llevó a cabo utilizando jeringas de tuberculina. Se registró la hora de administración y al finalizar, los animales fueron observados para detectar signos de toxicidad, cambios en el comportamiento o mortalidad de 1 a 3 horas post-administración y al menos una vez al día durante 14 días. Se registraron los signos clínicos presentados para cada sexo, dosis y producto.

Se registró el peso de cada animal los días 0 (recepción de animales), día 1 (día de la administración), 7 y 14 post-administración. Se realizó un análisis de los pesos de los ratones el programa SPSS 16 y mediante un modelo de mediciones repetidas considerando los siguientes factores: sexo (M: Macho; H: Hembra), tratamiento (referencia, prueba, vehículo y agua) y dosis (21, 63, 105, 157.5 y 210 mg/Kg), la variable repetida fue el día que se realizaron los pesajes (0, 1, 7 y 14 días).

Al terminar el estudio experimental los animales fueron pesados y después, utilizando una cámara de dióxido de carbono, método permitido en la NOM-062-ZOO-1999, se realizó la eutanasia.

2.4 Resultados

2.4.1 Registro de signos:

Una vez que se administraron los diferentes tratamientos, se registraron los signos clínicos de cada grupo. Los hallazgos más importantes para todos los grupos y en las dosis/volumen más altos, fueron: incoordinación, postración y temblores post administración; los animales se recuperaron en un periodo de 30 segundos como máximo en todos los casos. Los signos se registraron de acuerdo al grado de severidad en una escala numérica. Éstos se resumen en el **cuadro 2.2**.

Cuadro 2.2 Signología posadministración de tratamientos.

Se administró medicamento de prueba, Herceptin® excipiente y agua inyectable por vía intravenosa. La administración de agua no generó signología.

Grupo	Dosis mg/kg	Efecto toxicológico presentado	Número	GPET
Medicamento de prueba ♀	157.5	Incoordinación	5	Ligero
	210	Postración	5	Ligero
		Temblores	5	Ligero
Herceptin ♀	63	Postración	5	Ligero
	105	Incoordinación	5	Ligero
		157.5	Actividad motora disminuida	1
	Incoordinación		4	Ligero
	Disminución de la exploración		1	Alto
	Disminución del aseo		1	Alto
	Retorcimiento		1	Ligero
	Postración		1	Alto
	Temblores		1	Ligero
	Respiración irregular		2	Moderado
210	Incoordinación	5	Ligero	
Excipiente ♀		Postración	5	Ligero
Medicamento de prueba ♂	210	Saltos	1	Alto
		Tono muscular disminuido	1	Ligero
		Convulsiones	1	Moderado
		Respiración irregular	2	Moderado
Herceptin ♂	157.5	Postración	1	Ligero
		Temblores	1	Ligero
	210	Postración	5	Ligero
Excipiente ♂		Convulsiones	1	Moderado
		Postración	1	Ligero
		Respiración irregular	2	Moderado

*GPET: grado de presentación del efecto toxicológico.

2.4.2 Registro de peso corporal

Una vez registrados los pesos de cada animal a los distintos días de tratamiento, se calculó la línea de crecimiento por grupo y por sexo, para determinar si existían diferencias estadísticas, no hubo diferencias entre tratamientos en el peso de las hembras ni en machos. Estos resultados se muestran en las **figuras 2.1 y 2.2**.

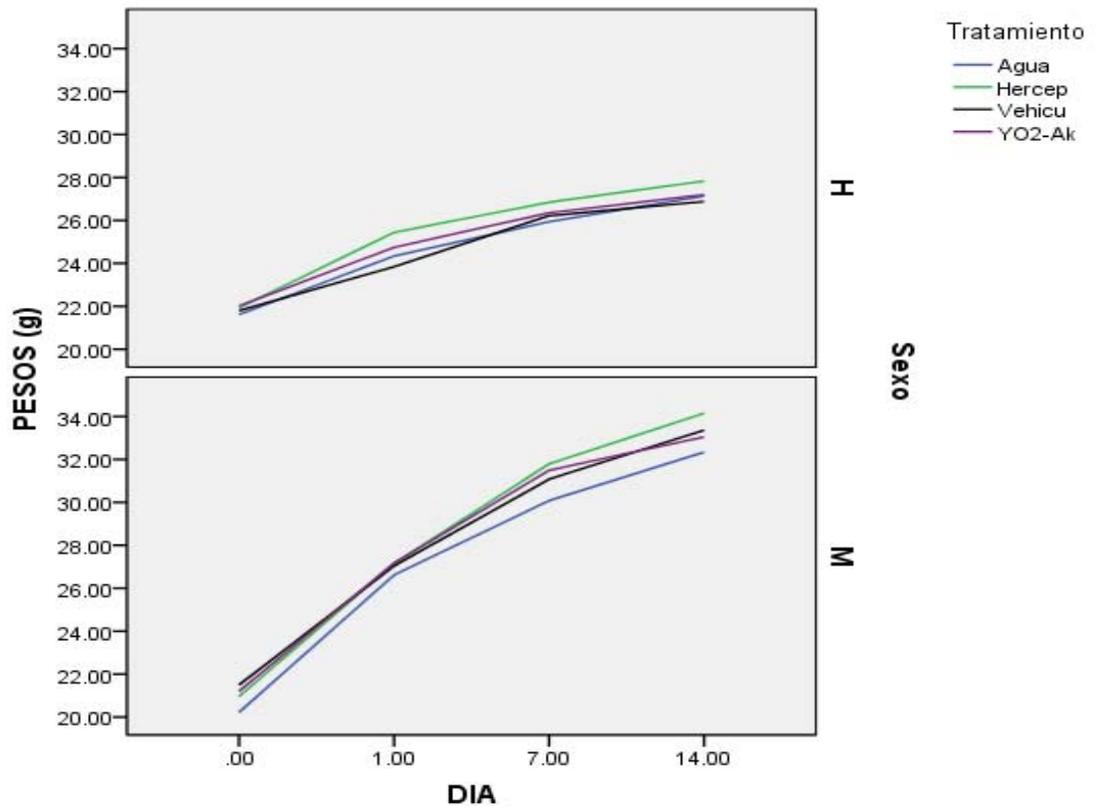


Figura 2.1 Líneas de crecimiento ratones hembras y machos.

Líneas de crecimiento de los ratones hembras y machos al día 0, 1, 7 y 14 de tratamiento, mostrando un peso similar para todos los grupos de tratamiento en ambos sexos.

*hembras (H) y machos (M) Hsd: ICR (P=0.57; 1-β=0.80). YO2Ak=medicamento de prueba.

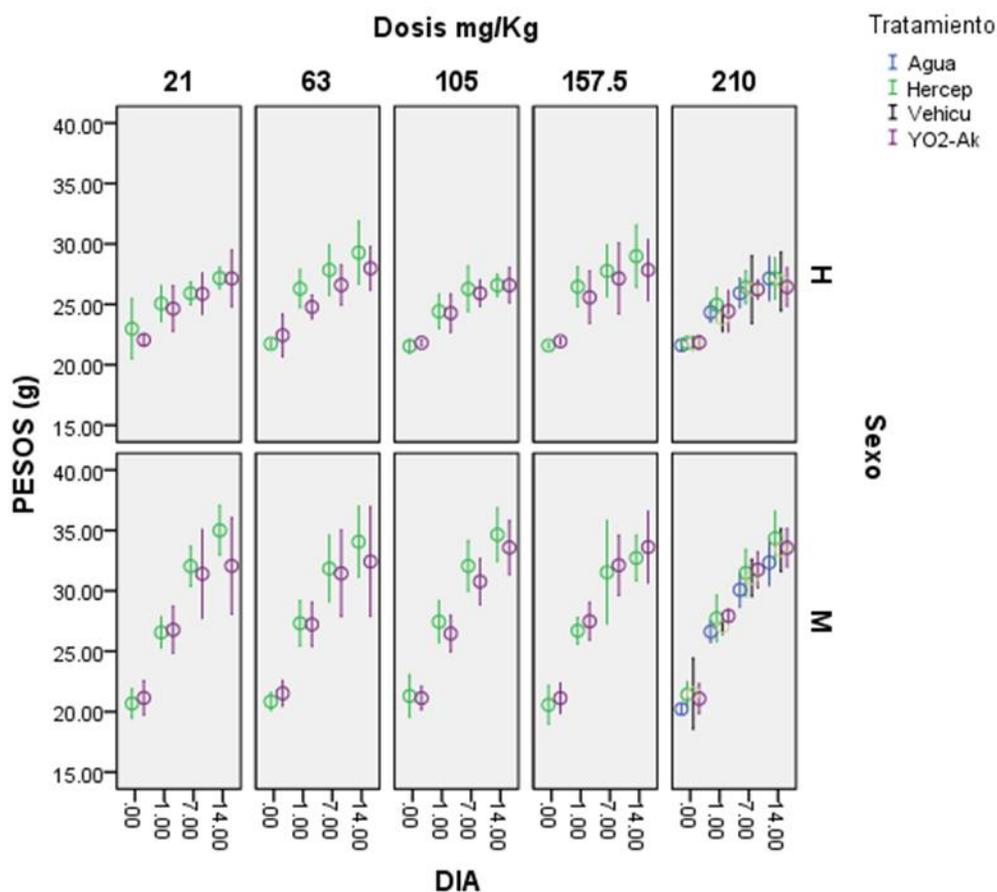


Figura 2.2 Intervalos de confianza para medias de pesos

Intervalos de confianza del 95% (indicados en las barras dentro de los bloques) para las medias de los pesos de los ratones Hsd: ICR machos (M) y hembras (H) en los distintos tratamientos y dosis que no afectan el crecimiento en ambos sexos ($P=0.74$, $1-\beta=0.72$). *Hercep= medicamento de referencia, YO2AK= medicamento de prueba, Vehicu= vehículo del medicamento de prueba.

2.5 Discusión

Los efectos adversos observados para el medicamento de referencia, medicamento de prueba y vehículo, se presentan en las dosis y/o volumen mayor y en su mayoría son ligeros y proporcionales a las dosis administradas. Su presentación fue transitoria y breve, con una recuperación total de los animales en un lapso máximo de 30 segundos. Podemos concluir que dichos efectos son atribuibles a la propia composición del vehículo (contiene alcohol bencílico) y a la concentración del fármaco, ya que éstos se presentaron

por igual en los tres grupos y no así en el agua inyectable. De acuerdo con los datos obtenidos, ninguna de las dosis empleadas en el presente estudio causó muerte y si bien hubo presentación de signos adversos, estos no fueron de relevancia para comprometer la vida de los animales. Esto coincide con lo reportado por el innovador en estudios de toxicidad aguda, donde Trastuzumab fue bien tolerado y no produjo evidencia de toxicidad sistémica por vía intravenosa a una dosis simple de 94 mg/kg en ratones. Vale la pena señalar que en este estudio tres de los niveles de dosis empleados (105, 157.5 y 210 mg/Kg) estaban por encima de la dosis más alta reportada por el innovador (Roche, 2010).

Debido a que en ninguna de las dosis establecidas se presentó mortalidad, se decidió realizar el análisis de pesos para determinar si existían diferencias entre grupos. De acuerdo con las **figuras 2.1 y 2.2**, el crecimiento de los ratones Hsd: ICR "S.P.F." (*Specific Pathogen Free*) fue similar en todos los tratamientos ($P=0.57$; $1-\beta=0.80$) y dosis ($P=0.74$, $1-\beta=0.72$), tanto en machos como en hembras.

No hubo diferencias en el crecimiento de los animales entre ninguno de los grupos tratados, aun cuando (como se mencionó anteriormente) se incluyeron dosis más elevadas a las indicadas en la monografía del medicamento de referencia, para los estudios de toxicidad aguda en el ratón. (Lange et al., 2011). Podemos afirmar que ambos compuestos fueron bien tolerados y no hay evidencia de toxicidad sistémica en ninguna de las dosis probadas. La administración intravenosa no produjo hallazgos de significancia toxicológica y los pocos efectos adversos fueron transitorios presentándose también con el vehículo, aunque con menor frecuencia.

2.6 Conclusiones

La toxicidad y el crecimiento observados en los ratones, con la administración del medicamento de referencia y el de prueba fue semejante entre ambos y ninguno de ellos causó la muerte de los animales, mostrando ambos ligeros efectos adversos con total recuperación. El estudio no arroja evidencia para afirmar que exista diferencia entre los productos.

3. ESTUDIOS DE SEGURIDAD: TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS

3.1 Introducción

En el caso de un estudio de biocomparabilidad, los estudios de toxicidad a dosis repetidas forman parte de una batería de pruebas encaminadas a evaluar las posibles diferencias entre un biocomparable (medicamento de prueba) y un innovador (referencia). Para la evaluación del biocomparable se considera suficiente el uso de una sola especie en un estudio de toxicidad aguda de forma comparativa con el innovador y el empleo de un modelo animal relevante para los estudios de toxicidad a dosis repetidas (WHO, 2009).

Se buscó contribuir a los estudios de biocomparabilidad entre el medicamento de prueba y el medicamento de referencia, mediante una prueba de seguridad, determinando la toxicidad a dosis repetidas en monos. Si el medicamento “biocomparable” y el de “referencia” son similares, los estudios toxicológicos lo serán y no deberán mostrar diferencias significativas en ninguna de las variables de respuesta evaluadas (signología, hemograma, bioquímica sanguínea, etc.).

Para el estudio de toxicidad a dosis repetidas, los análisis estadísticos de los resultados se realizaron de acuerdo con el tipo de variable de respuesta. Se declararon biocomparables, cuando además de no mostrar diferencia significativa ($P > 0.05$), la potencia fue de al menos 80% (Freund J.E., 2008).

El trastuzumab es específico para el receptor humano p185^{HER2} y no se une al receptor de roedor correspondiente (p185^{neu}). Sin embargo, el perfil de unión *in vitro* con trastuzumab en tejido de monos demostró que éste es un modelo apropiado para pruebas de toxicidad (Ningyan, 2011). Debido a lo anterior y a los reportes mostrados en la monografía del producto, en el que se indica que su aplicación endovenosa dos veces por semana durante cuatro semanas fue bien tolerado (Roche, 2010), se decidió emplear esta especie para realizar las pruebas de toxicidad a dosis repetidas.

3.2 Objetivos

Objetivo general:

Comparar el medicamento de prueba con el medicamento de referencia por medio de ensayos que brinden información adecuada de la toxicidad a dosis repetidas del “biocomparable” con respecto al medicamento de referencia.

Objetivos particulares:

- a) Comparar la toxicidad a dosis repetidas del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, en monos, para demostrar si éstos son biocomparables.
- b) Comparar la inmunogenicidad del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, en monos, para demostrar si éstos son biocomparables.

3.3 Metodología

3.3.1 Selección de la especie animal

Debido a que las células de mono expresan HER-2 en su superficie (Nordstrom et al., 2011, Ningyan, 2011), y a que estudios previos han demostrado que el trastuzumab se une con una afinidad semejante al receptor de humanos que al del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*; Junutula et al., 2010), se considera a ésta como la especie relevante de elección para realizar las pruebas de seguridad de este biocomparable. Además, cabe destacar que el trastuzumab no se une al Her-2 de ratas (Lewis Phillips et al., 2008).

En el presente estudio se evaluó la toxicidad en un esquema de tratamiento a dosis múltiples por vía intravenosa, en monos (*Macaca mulatta*). Con base en la monografía del innovador para la EMEA (2005), se empleó una sola dosis de los fármacos de prueba: 25 mg/Kg por vía i.v. administrada dos veces por semana durante cuatro semanas (EMEA, 2005).

El trabajo se hizo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a la Normatividad del Código Zoosanitario Internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS); y con la

aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y de las comisiones de Ética e Investigación del Centro de Investigación Proyecto CAMINA, A.C.

3.3.2 Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales pertenecen a la Unidad de Primates No Humanos (PNH) del *Centro de Investigación Proyecto CAMINA para Curar la Parálisis A.C. en México D.F. C.P. 1405*, la cual está dada de alta y registrada con el número DGVS-PIMVS-CR-IN-1014-D.F./08 ante la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

La colonia de primates no humanos (PNH) consistió en 73 individuos, alojados en condiciones grupales, conformados por 44 hembras y 29 machos de diferentes edades (entre 0 y 27 años de edad), de los cuales se lleva un registro desde el nacimiento. Las instalaciones en donde se alojan a los PNH se encontraban divididas en cuatro áreas, cada una conformaba un grupo social de animales independiente con el objetivo de promover el bienestar animal. Cada área contaba con bebederos automáticos y depósitos de alimento. Los animales se alimentaban con base en el 4% de su peso corporal, con MonkeyChow Purina 5045® (25% proteína) dos veces al día y agua *ad libitum*.

3.3.3 Diseño del estudio

De la colonia mencionada anteriormente se utilizaron 24 monos (12 machos y 12 hembras) de entre 3 y 20 años de edad y con pesos entre 3,800 g y 12,600 g. Los animales fueron registrados por nombre propio, clave y fotografía, y se alojaron en las condiciones de cautiverio antes mencionadas. Se hicieron tres grupos de ocho animales cada uno (4 hembras y 4 machos) como se muestra en los **cuadros 3.1-3.3**.

El tamaño de muestra se obtuvo con el programa G*Power (Faul et al., 2007) versión 3.1.3 y asegura una significancia de 0.05 y una potencia de 0.93.

Cuadro 3.1 Grupos de estudio para toxicidad a dosis múltiples

monos <i>Macaca mulatta</i>	
Grupo	No. de animales
25mg/Kg de Med. prueba	4 ♀ y 4 ♂
25mg/Kg de Med. referencia	4 ♀ y 4 ♂
Placebo	4 ♀ y 4 ♂

(Excipiente del Med. prueba)

Resumen de los grupos de monos empleados en el estudio de toxicidad a dosis múltiples. Se utilizaron tres grupos de monos (medicamento de prueba, medicamento de referencia y placebo) de ocho animales cada uno (cuatro hembras y cuatro machos).

Cuadro 3.2 Registro de las hembras empleados en el estudio

NOMBRE	FOTO	EDAD	FECHA DE NACIMIENTO	SEXO	TRATAMIENTO
ALDONZA		6	09-06-06	H	Medicamento de referencia
GUMA		8	23-02-04	H	Medicamento de referencia
MANDY		6	26-06-06	H	Medicamento de referencia
MINA		6	10-05-06	H	Medicamento de referencia
PITA		7	04-07-05	H	Placebo
PUKA		3	12-06-09	H	Placebo
NISSA		6	09-05-06	H	Placebo
PIA		5	14-05-07	H	Placebo
ARAMIZ		8	05-03-04	H	Medicamento de prueba
LUA		6	22-12-06	H	Medicamento de prueba
TITA		7	19-04-05	H	Medicamento de prueba
KIKI		7	05-06-05	H	Medicamento de prueba

Cuadro 3.3 *Registro de los machos empleados en el estudio*

NOMBRE	FOTO	EDAD	FECHA DE NACIMIENTO	SEXO	TRATAMIENTO
BONO		19	1993	M	Medicamento de referencia
CASIO		17	1995	M	Medicamento de referencia
PENA		8	26-06-04	M	Medicamento de referencia
SALVATORE		6	26-04-06	M	Medicamento de referencia
EULOGIO		8	11-03-04	M	Placebo
JERICO		7	27-06-05	M	Placebo
MARTIN		7	13-03-05	M	Placebo
PANICO		8	29-05-04	M	Placebo
BAYITO		5	19-06-08	M	Medicamento de prueba
HUGO		8	11-03-04	M	Medicamento de prueba
MAX		6	26-06-06	M	Medicamento de prueba
PANCHO		20	1992	M	Medicamento de prueba

El medicamento de prueba se recibió en frasco ampola de 150 mg como polvo liofilizado homogéneo de color blanco a amarillo pálido en pastilla.

El medicamento de referencia se recibió en frasco ampola con 440 mg de trastuzumab en polvo y frasco ampola con diluyente conteniendo 220 mg de alcohol bencílico y 20 mL de agua inyectable.

El vehículo del medicamento de prueba fue utilizado como placebo.

Las sustancias de prueba se mantuvieron en refrigeración y se reconstituyeron en conformidad a las recomendaciones del fabricante. El transporte de los medicamentos desde la UNIPREC a CAMINA A.C. se hizo en hieleras con refrigerante cada día de la aplicación y se mantuvieron en dicha hielera durante la administración del mismo. Al término de cada administración, el fármaco sobrante se transportó de regreso a la UNEXA para su resguardo en refrigeración.

3.3.4 Preparación de las dosis

Los productos de prueba y referencia fueron provistos por la farmacéutica mexicana interesada en el estudio. Se empleó una sola dosis i.v. administrada dos veces por semana durante cuatro semanas para observar los posibles efectos tóxicos. La administración se hizo con agujas calibre 21 y jeringas de 5 ó 10 mL dependiendo del volumen a administrar. El tratamiento inició el día 09 de octubre de 2012 y terminó el día 08 de noviembre de 2012. Los animales se observaron por un período de cuatro semanas más después de la última administración del producto (hasta el 06 de diciembre de 2012).

3.3.5 Toma de muestras, constantes fisiológicas y electrocardiograma

Para el correcto manejo de los animales y la toma de muestras sanguíneas, éstos se sometieron a una sedación ligera con 4mg/Kg de tiletamina/zolazepam (Zoletil®), utilizando una jeringa de insulina. Cabe señalar que el empleo de este anestésico no altera los resultados del hemograma ni la bioquímica sanguínea (Ibanez-Contreras et al., 2013, Ibáñez-Contreras, 2011).

3.3.5.1 Toma de muestras sanguíneas para hemograma, bioquímica e inmunogenicidad.

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena femoral empleando jeringas de 10 mL y aguja de calibre 22, obteniéndose aproximadamente 6 mL de sangre, los cuales se dividieron en dos partes: 1 mL en MicroTainers con EDTA para hemograma y 5 mL en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero (necesario para los análisis de bioquímica sanguínea e inmunogenicidad). Todas las muestras fueron registradas y etiquetadas con la clave del macaco y la hora de toma de muestra. Fueron transportadas al Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ, UNAM) en hieleras con refrigerante y cubiertas de la luz. La toma de muestras sanguíneas se realizó a las 0, 4 y 8 semanas.

3.3.5.2 Toma de muestras sanguíneas para Creatina cinasa (CK)

Las muestras sanguíneas se obtuvieron de la vena femoral empleando jeringas de 3 mL, obteniéndose aproximadamente 1 mL de sangre en tubo MicroTainer sin anticoagulante, dos veces por semana durante las primeras cuatro semanas. CK es una isoenzima que está compuesta a su vez por tres isoenzimas, CK1, que predomina en cerebro, CK2 y CK3 que predominan en músculo esquelético y cardíaco.

Debido a que se ha informado cardiotoxicidad del producto, se decidió hacer un monitoreo con la enzima CK para evaluar de forma indirecta lesión cardíaca y contar con una referencia para saber si se tendría que hacer un estudio más específico. En caso de que fueran encontrados incrementos persistentes y progresivos en este analito (en dos tomas consecutivas), se procedería a la realización de un electrocardiograma adicional y determinación de troponinas.

3.3.5.3 Constantes fisiológicas

La frecuencia respiratoria y cardíaca se tomó mediante auscultación con estetoscopio. Las constantes fisiológicas (temperatura, presión sistólica y diastólica, así como la saturación de oxígeno) se midieron con un monitor electrofluorescente de 9^ª marca Mennen® modelo Enmove 1000. La tensión arterial se tomó del muslo derecho en posicionamiento de la arteria femoral. La saturación de oxígeno se midió con un dedal pediátrico en el dedo pulgar del miembro posterior izquierdo. La temperatura se registró por vía rectal con el

termómetro del equipo antes mencionado. El peso corporal se determinó en forma individual.

3.3.5.4 Electrocardiogramas (ECG)

La toma de los ECG se realizó a los 24 monos del estudio el día de inicio y de término del tratamiento. Para ésta, los animales fueron anestesiados con tiletamina-zolazepam, según se mencionó anteriormente. Se colocaron en posición decúbito dorsal y la colocación de los electrodos se hizo en las palmas de las manos derecha e izquierda y en el miembro posterior izquierdo. Se utilizó un electrocardiógrafo, Cadiomaq Vet y se registraron las derivadas I, II y III, así como aVR, aVL y aVF.

3.3.6 Procesamiento de muestras

3.3.6.1 Hematología

El manejo y procesamiento de la muestra para hemograma se llevó a cabo siguiendo los procedimientos certificados del laboratorio de hematología del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, referidos en el instructivo del proceso de realización del servicio de diagnóstico del propio laboratorio. Para la determinación del hematocrito, conteo total de eritrocitos, leucocitos, concentración de hemoglobina, cantidad de plaquetas, y determinación de índices eritrocíticos: volumen globular medio (VGM) y concentración globular media de hemoglobina (CGMH) se utilizó un analizador hematológico automatizado, marca Mindray, modelo BC-280Vet (China). El diferencial de leucocitos y evaluación morfológica celular se realizó manualmente por microscopía óptica en un frotis sanguíneo teñido con Wright, esto de acuerdo al procedimiento referido en el catálogo de técnicas, métodos e instructivos del laboratorio de hematología de la FMVZ-UNAM. La determinación de los sólidos totales (proteínas totales) en hematología se realizó por la técnica de refractometría.

Los analitos determinados fueron los siguientes:

- Hematocrito
- Eritrocitos
- Hemoglobina
- Volumen globular medio (VGM)

- Concentración globular media de hemoglobina (CGMH)
- Plaquetas
- Cuenta total y diferencial de leucocitos
- Observación del frotis sanguíneo
- Determinación de sólidos totales (proteínas totales)

3.3.6.2 Bioquímica Clínica

El procesamiento de la muestra para bioquímica sanguínea se hizo siguiendo los procedimientos certificados del Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, referidos en el instructivo del proceso de realización del servicio de diagnóstico del propio laboratorio. Para la determinación de los analitos bioquímicos se empleó el equipo espectrofotómetro semiautomatizado Selectra Junior (Holanda).

Los analitos evaluados permiten detectar alteraciones en la integridad y función del parénquima hepático y vías biliares, función renal, metabolismo de proteínas y alteraciones musculares (músculo esquelético y cardíaco).

- Creatinina
- Alaninaaminotransferasa (ALT)
- Fosfatasa alcalina (FA)
- Urea
- Bilirrubinas totales
- Albúmina
- Creatinincinasa (CK)

3.3.6.3 Inmunogenicidad

En este estudio se buscó comparar los niveles de anticuerpos generados tras la administración de los productos en los monos del estudio. Es importante señalar que este ensayo no pretendió extrapolar los resultados al humano, dado que es de esperarse que la respuesta inmunológica que pueda despertar sea distinta entre ambas especies.

La determinación del nivel de anticuerpos anti-medicamento de prueba y anti-medicamento de referencia, se hizo mediante la prueba de ELISA indirecta. Los ensayos

se realizaron en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM. Los sueros se trabajaron en un gabinete de seguridad biológica clase II marca Nuair.

Debido a que no se contaba con un suero de mono positivo al medicamento de referencia o de prueba, se decidió inmunizar conejos con estos productos. La prueba se estandarizó empleando la proteína G peroxidada, debido a que ésta se une tanto a IgG de mono como a la de conejo.

Como antígenos se utilizaron el medicamento de prueba y de referencia diluidos en solución amortiguadora de carbonatos. Los medicamentos se almacenaron en refrigeración hasta su uso. Éstos se fijaron en placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano MAXISORP marca NUNC, empleando una concentración de 0.16µg por pozo. Las placas se incubaron en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente se lavaron cuatro veces con 100 mL de solución de lavado por pozo. Los sueros de mono se diluyeron 1/10 en la solución salina amortiguadora de fosfatos, se colocaron 50µL en cada pozo (por duplicado) y se incubaron a 30°C durante 2 horas a 37°C en estufa (marca Quimis). Posteriormente las placas se lavaron cuatro veces con 100 µL de solución de lavado por pozo y se les adicionó la proteína G peroxidada (marca BIORAD) diluida 1/200,000 en la solución salina amortiguadora de fosfatos. Las placas se incubaron a 30°C durante 2 horas en la estufa referida anteriormente y después se lavaron cuatro veces con 100 µL de solución de lavado. Posteriormente se adicionaron 100 µL de TMB en solución amortiguadora de citratos por pozo y se incubaron 30 min a 30°C. Finalmente se adicionó una solución de paro y se hizo la lectura de densidad óptica a 450 nm con un lector de ELISA (marca Thermo Electron Corporation). Todas las muestras y reactivos fueron manejadas utilizando pipetas Labnet de 0.5-10 µL, 2- 20 µL, 20- 200 µL, 100- 1000 µL y pipeta multicanal de 20 – 200 µL, con códigos PAI9-017, 016, 014, 015 y 018 respectivamente.

Los testigos positivos corresponden a sueros de conejos previamente hiperinmunizados con el medicamento de prueba y el de referencia y se emplearon a una dilución 1/50 y 1/100. Los sueros mencionados se obtuvieron en la FMVZ.

3.3.7 Análisis estadístico

Los pesos se analizaron mediante un análisis de mediciones repetidas (Park et al., 2009). Los hemogramas, bioquímicas y las amplitudes de las ondas P, Q, R S y T, así como del complejo duración QRS de los ECG, se analizaron por medio de un modelo mixto lineal (Gill, 2000).

3.4 Resultados

3.4.1 Tolerabilidad local.

No se registró ninguna lesión en el sitio de administración del medicamento.

3.4.2 Pesos

Los animales registraron una baja de peso durante la administración de los tratamientos. Debido a lo anterior se decidió hacer un análisis estadístico para determinar si esta disminución podría atribuirse al tratamiento o se debía al ayuno practicado los días de administración para evitar complicaciones con la sedación.

El peso se analizó mediante un análisis de varianza de mediciones repetidas, con el pesaje, como factor intra-sujetos (Gill, 2000). Los factores entre-sujetos fueron: el Sexo del mono (H: hembra, M: macho) y el tratamiento (referencia, prueba, placebo).

Se encontró una disminución de peso significativa en todos los grupos, del primer al segundo pesaje ($P=0.001$), pero en el tercero se mantuvieron similares al segundo ($P=0.063$). Dicha disminución no es atribuible al tratamiento, ya que todos los grupos la mostraron ($P=0.21$), según se muestra en la **figura 3.1**. Por otro lado, las hembras iniciaron con menor peso que los machos y sufrieron una disminución del primer al segundo pesaje, equivalente al observado en el análisis de los tratamientos ($P=0.043$) sin ser atribuible al tratamiento, ya que en todos los grupos se observó el mismo comportamiento sin importar el sexo ($P=0.49$), **figura 3.2**.

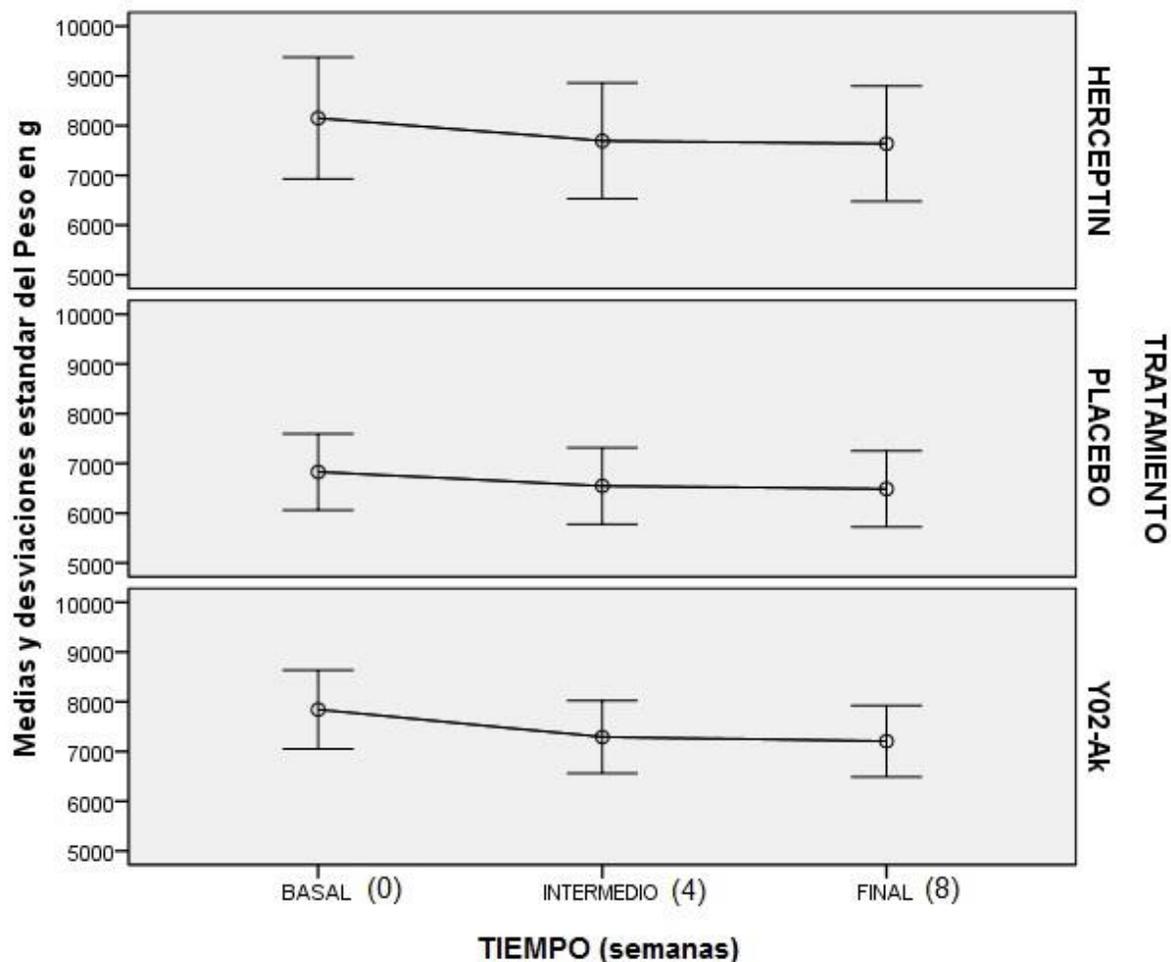


Figura 3.1 *Medias marginales y desviaciones estándar del peso de los monos*

Se muestra el peso (g) basal (día 1), intermedio (semana 4) y final (semana 8) de los monos en los tres tratamientos; se indican las medias y desviaciones estándar. Herceptin=medicamento de referencia, Y02Ak=medicamento de prueba.

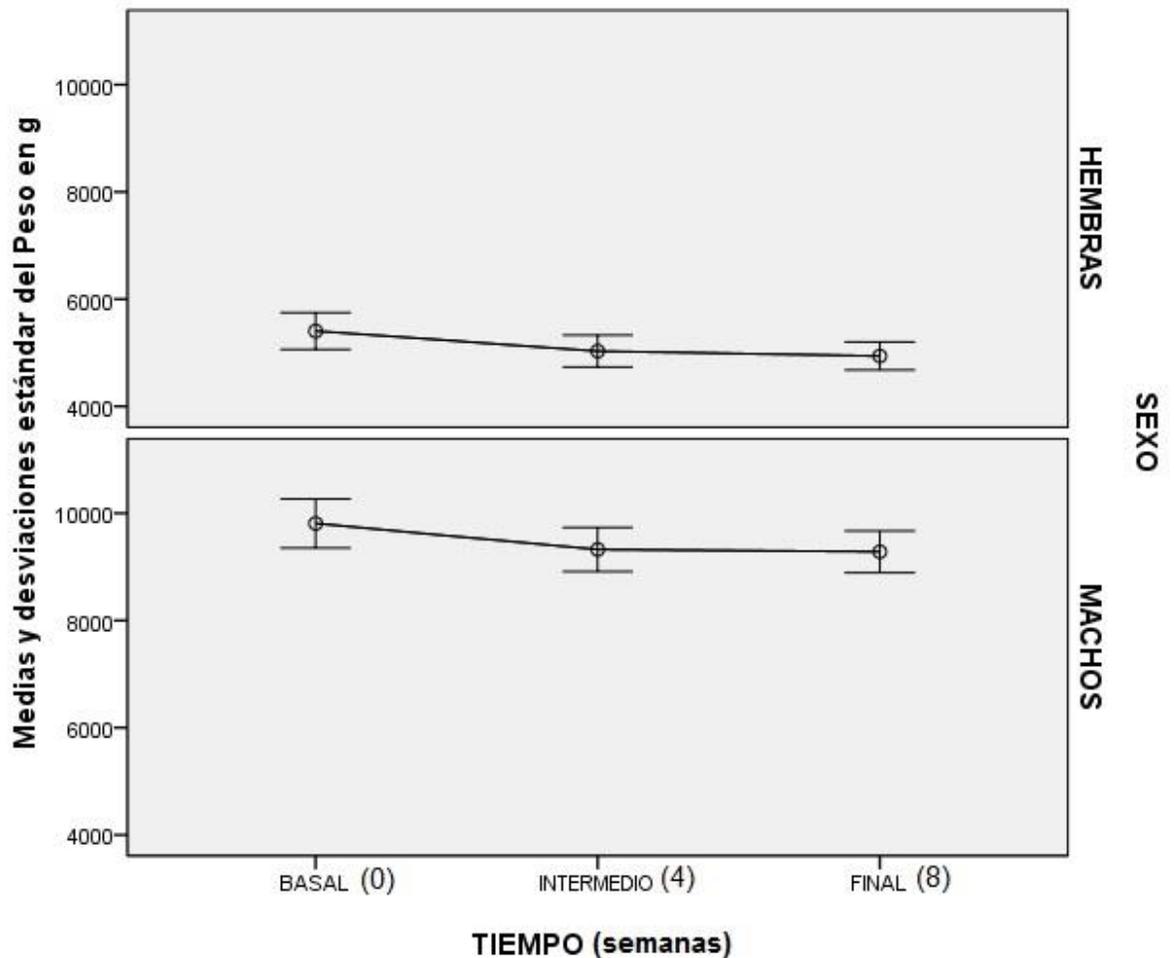


Figura 3.2 *Medias marginales y desviaciones estándar de pesos de monos*

Se muestra el peso (g) basal (día 1), intermedio (semana 4) y final (semana 8) de los monos divididos por sexo; se indican las medias y desviaciones estándar.

3.4.3 Hemogramas

El análisis se realizó por medio de un modelo mixto lineal (Gill, 2000), con la variable intrasujeto, muestreo (basal, intermedio, final) y los factores inter sujeto, sexo (hembra, macho) y tratamiento (referencia, prueba, placebo). Se muestran medias \pm error estándar de cada uno de los analitos, así como sus valores de referencia.

En el **cuadro 3.4**, se muestran los resultados de los analitos obtenidos en los diferentes tratamientos a través de las tres mediciones. Se encontraron diferencias significativas en algunos analitos del hemograma, sin relevancia.

Cuadro 3.4 *Análisis estadístico de hemogramas en monos de ambos sexos*

ANALITOS	VALORES NORMALES	HEMBRAS			
		MEDICIÓN DE TIEMPO	REFERENCIA	PLACEBO	PRUEBA
HEMATOCRITO (L/L)	0.37-0.43	BASAL	0.46±0.01 ^a	0.44±0.01 ^a	0.45±0.01 ^a
		INTERMEDIA	0.41±0.01 ^a	0.43±0.01 ^a	0.45±0.01 ^b
		FINAL	0.44±0.01 ^a	0.45±0.01 ^a	0.46±0.01 ^a
HEMOGLOBINA (g/L)	123-137	BASAL	135.00±5.02 ^a	131.50±5.02 ^a	137.50±5.02 ^a
		INTERMEDIA	125.25±5.02 ^a	133.50±5.02 ^a	136.50±5.02 ^a
		FINAL	131.00±5.02 ^a	134.25±5.02 ^a	140.50±5.02 ^a
ERITROCITOS (X10 ¹² /L)	5.4-6.1	BASAL	6.50±0.22 ^a	6.47±0.22 ^a	6.50±0.22 ^a
		INTERMEDIA	5.92±0.22 ^a	6.37±0.22 ^a	6.37±0.22 ^a
		FINAL	6.27±0.22 ^a	6.37±0.22 ^a	6.42±0.22 ^a
VGM (FL)	65-73	BASAL	70.75±2.25 ^a	69.00±2.25 ^a	70.50±2.25 ^a
		INTERMEDIA	70.75±2.25 ^a	68.50±2.25 ^a	71.50±2.25 ^a
		FINAL	70.50±2.25 ^a	70.50±2.25 ^a	72.50±2.25 ^a
CGMH (g/L)	313-333	BASAL	292.50±4.59 ^a	296.25±4.59 ^a	301.25±4.59 ^a
		INTERMEDIA	299.00±4.59 ^a	306.74±4.59 ^a	300.25±4.59 ^a
		FINAL	297.00±4.59 ^a	298.75±4.59 ^a	301.50±4.59 ^a
PLAQUETAS (X10 ⁹ /L)	290-590	BASAL	342.00±30.2 ^{7a}	257.00±30.2 ^{7b}	267.25±30.2 ^{7a}
		INTERMEDIA	318.00±30.2 ^{7a}	399.00±30.2 ^{7a}	249.25±30.2 ^{7a}
		FINAL	317.50±30.2 ^{7a}	214.50±30.2 ^{7b}	249.00±30.2 ^{7a}
SÓLIDOS TOTALES (g/L)	69- 77	BASAL	71.00±1.94 ^a	69.50±1.94 ^a	64.00±1.94 ^b
		INTERMEDIA	70.50±1.94 ^a	75.50±1.94 ^a	67.50±1.94 ^a
		FINAL	72.50±1.94 ^a	71.50±1.94 ^a	67.25±1.94 ^a
LEUCOCITOS (X10 ⁹ /L)	7.4-12.4	BASAL	6.60±1.14 ^a	8.30±1.14 ^a	8.75±1.14 ^a
		INTERMEDIA	6.10±1.14 ^a	11.95±1.14 ^b	7.30±1.14 ^a
		FINAL	10.80±1.14 ^a	8.70±1.14 ^a	7.00±1.14 ^b
NEUTRÓFILOS (x10 ⁹ /L)	3.7-7.9	BASAL	4.87±1.06 ^a	3.72±1.06 ^a	4.95±1.06 ^a
		INTERMEDIA	3.75±1.06 ^a	8.72±1.06 ^b	4.27±1.06 ^a
		FINAL	4.85±1.06 ^a	4.85±1.06 ^a	3.77±1.06 ^a
LINFOCITOS (x10 ⁹ /L)	2.1- 5.1	BASAL	1.52±0.42 ^a	4.20±0.42 ^b	3.42±0.42 ^c
		INTERMEDIA	1.87±0.42 ^a	2.90±0.42 ^a	2.47±0.42 ^a
		FINAL	5.27±0.42 ^a	3.32±0.42 ^b	2.85±0.42 ^c
MONOCITOS(x10 ⁹ /L)	<0.5	BASAL	0.17±0.06 ^a	0.22±0.06 ^a	0.32±0.06 ^a
		INTERMEDIA	0.40±0.06 ^a	0.22±0.06 ^a	0.30±0.06 ^a
		FINAL	0.25±0.06 ^a	0.30±0.06 ^a	0.27±0.06 ^a
EOSINÓFILOS(x10 ⁹ /L)	<0.3	BASAL	0.02±0.04 ^a	0.12±0.04 ^a	0.05±0.04 ^a
		INTERMEDIA	0.07±0.04 ^a	0.10±0.04 ^a	0.22±0.04 ^b
		FINAL	0.42±0.04 ^a	0.20±0.04 ^b	0.07±0.04 ^c
BASÓFILOS ¹	<0.1		0.00	0.00	0.00

ANALITO	VALORES NORMALES	MACHOS			
		MEDICIÓN DE TIEMPO	REFERENCIA	PLACEBO	PRUEBA
HEMATOCRITO (L/L)	0.37-0.43	BASAL	0.50±0.01 ^a	0.48±0.01 ^a	0.50±0.01 ^a
		INTERMEDIA	0.48±0.01 ^a	0.47±0.01 ^a	0.48±0.01 ^a
		FINAL	0.50±0.01 ^a	0.49±0.01 ^a	0.50±0.01 ^a
HEMOGLOBINA (g/L)	123-137	BASAL	149.25±5.02 ^a	146.50±5.02 ^a	149.50±5.02 ^a
		INTERMEDIA	149.25±5.02 ^a	147.75±5.02 ^a	150.25±5.02 ^a
		FINAL	154.50±5.02 ^a	149.25±5.02 ^a	157.00±5.02 ^a
ERITROCITOS (X1012/L)	5.4-6.1	BASAL	6.90±0.22 ^a	6.77±0.22 ^a	6.80±0.22 ^a
		INTERMEDIA	6.65±0.22 ^a	6.80±0.22 ^a	6.60±0.22 ^a
		FINAL	6.95±0.22 ^a	6.77±0.22 ^a	6.95±0.22 ^a
VGM (FL)	65-73	BASAL	73.75±2.25 ^a	72.00±2.25 ^a	74.25±2.25 ^a
		INTERMEDIA	73.25±2.25 ^a	69.25±2.25 ^a	73.50±2.25 ^a
		FINAL	73.00±2.25 ^a	72.75±2.25 ^a	73.75±2.25 ^a
CGMH (g/L)	313-333	BASAL	293.75±4.59 ^a	301.50±4.59 ^a	294.50±4.59 ^a
		INTERMEDIA	306.75±4.59 ^a	312.25±4.59 ^a	310.50±4.59 ^a
		FINAL	305.50±4.59 ^a	304.75±4.59 ^a	307.50±4.59 ^a
PLAQUETAS (X109/L)	290-590	BASAL	287.00±30.2 7 ^a	249.50±30.2 7 ^a	333.00±30.2 7 ^a
		INTERMEDIA	242.00±30.2 7 ^a	234.25±30.2 7 ^a	306.50±30.2 7 ^a
		FINAL	294.25±30.2 7 ^a	297.50±30.2 7 ^a	356.25±30.2 7 ^a
SOLIDOS TOTALES (g/L)	69- 77	BASAL	71.50±1.94 ^a	68.25±1.94 ^a	73.00±1.94 ^a
		INTERMEDIA	71.00±1.94 ^a	69.50±1.94 ^a	76.00±1.94 ^a
		FINAL	74.50±1.94 ^a	73.00±1.94 ^a	78.00±1.94 ^a
LEUCOCITOS (X109/L)	7.4-12.4	BASAL	7.37±1.14 ^a	7.05±1.14 ^a	8.77±1.14 ^a
		INTERMEDIA	7.50±1.14 ^a	9.15±1.14 ^a	8.55±1.14 ^a
		FINAL	6.45±1.14 ^a	7.27±1.14 ^a	7.27±1.14 ^a
NEUTROFILOS (x109/L)	3.7-7.9	BASAL	5.17±1.06 ^a	4.67±1.06 ^a	6.10±1.06 ^a
		INTERMEDIA	5.42±1.06 ^a	6.05±1.06 ^a	6.80±1.06 ^a
		FINAL	3.87±1.06 ^a	4.72±1.06 ^a	4.20±1.06 ^a
LINFOCITOS (x109/L)	2.1- 5.1	BASAL	2.00±0.42 ^a	2.27±0.42 ^a	2.47±0.42 ^a
		INTERMEDIA	1.82±0.42 ^a	2.77±0.42 ^a	1.60±0.42 ^a
		FINAL	2.25±0.42 ^a	2.35±0.42 ^a	2.67±0.42 ^a
MONOCITOS (x109/L)	<0.5	BASAL	0.17±0.06 ^a	0.10±0.06 ^a	0.10±0.06 ^a
		INTERMEDIA	0.10±0.06 ^a	0.22±0.06 ^a	0.07±0.06 ^a
		FINAL	0.27±0.06 ^a	0.12±0.06 ^a	0.25±0.06 ^a
EOSINÓFILOS (x109/L)	<0.3	BASAL	0.00±0.04 ^a	0.00±0.04 ^a	0.75±0.04 ^a
		INTERMEDIA	0.12±0.04 ^a	0.05±0.04 ^a	0.07±0.04 ^a
		FINAL	0.05±0.04 ^a	0.05±0.04 ^a	0.15±0.04 ^a
BASÓFILOS ¹	<0.1		0.00	0.00	0.00

^{a,b,c} literales diferentes denotan diferencias significativas (p<0.05) en renglones. 1: Los basófilos se mantuvieron en 0.0 durante todo el estudio.

3.4.4 Bioquímicas

El análisis se realizó por medio de un modelo mixto lineal (Gill, 2000), con la variable intrasujeto muestreo (basal, intermedio, final) y los factores inter sujeto sexo (hembra, macho) y tratamiento (referencia, prueba placebo).

Se muestran medias \pm error estándar de cada uno de los analitos, así como sus valores de referencia, **cuadro 3.5**. Los valores de ALT en ambos sexos fueron más altos que los de referencia, pero no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) excepto en los machos que se elevaron en el grupo placebo en la medición intermedia ($P < 0.05$). Los niveles de creatinina mostraron diferencias significativas, éstas se presentaron desde la medición intermedia, los valores más elevados y fuera de límites fisiológicos los presentaron tanto hembras como machos, pero estos últimos tuvieron valores fuera de límites fisiológicos desde la medición basal. En machos los valores se mantuvieron elevados durante todo el estudio, en las hembras, los valores de creatinina se elevaron en los grupos tratados con placebo y el medicamento de prueba en las mediciones intermedia y final. Los niveles medios de urea, en la medición final del medicamento de prueba fueron los más altos, además de ser mayores que los valores de referencia. El criterio para significancia fue $P < 0.05$.

Cuadro 3.5 Análisis estadístico de química sanguínea en monos de ambos sexos

		HEMBRAS			
ANALITOS	VALORES NORMALES	MEDICIÓN DE TIEMPO	REFERENCIA	PLACEBO	PRUEBA
CREATININA	70 – 88 $\mu\text{mol/L}$	BASAL	77.25 \pm 5.71 ^a	83.00 \pm 5.71 ^a	77.75 \pm 5.71 ^a
		INTERMEDIA	72.50 \pm 5.71 ^a	92.50 \pm 5.71 ^b	89.75 \pm 5.71 ^c
		FINAL	75.50 \pm 5.71 ^a	92.50 \pm 5.71 ^b	89.00 \pm 5.71 ^a
UREA	5.7 – 8.5 mmol/L	BASAL	6.90 \pm 0.45 ^a	7.25 \pm 0.45 ^a	6.85 \pm 0.45 ^a
		INTERMEDIA	8.02 \pm 0.45 ^a	8.00 \pm 0.45 ^a	7.90 \pm 0.45 ^a
		FINAL	8.72 \pm 0.45 ^a	8.17 \pm 0.45 ^a	11.20 \pm 0.45 ^b
ALBUMINA	42 – 50 g/L	BASAL	39.00 \pm 1.04 ^a	39.75 \pm 1.04 ^a	36.50 \pm 1.04 ^a
		INTERMEDIA	34.25 \pm 1.04 ^a	37.00 \pm 1.04 ^a	34.50 \pm 1.04 ^a
		FINAL	35.00 \pm 1.04 ^a	38.00 \pm 1.04 ^b	36.25 \pm 1.04 ^a
FA	363 – 653 U/L	BASAL	588.50 \pm 101.87 ^a	551.25 \pm 101.87 ^a	514.75 \pm 101.87 ^a
		INTERMEDIA	496.25 \pm 101.87 ^a	595.00 \pm 101.87 ^a	498.25 \pm 101.87 ^a
		FINAL	428.50 \pm 101.87 ^a	525.00 \pm 101.87 ^a	420.50 \pm 101.87 ^a
ALT	26 – 48 U/L	BASAL	194.00 \pm 47.17 ^a	112.75 \pm 47.17 ^a	94.00 \pm 47.17 ^a
		INTERMEDIA	181.50 \pm 47.17 ^a	148.75 \pm 47.17 ^a	125.25 \pm 47.17 ^a
		FINAL	47.00 \pm 47.17 ^a	62.50 \pm 47.17 ^a	61.25 \pm 47.17 ^a
BILIRRUBINA	1.7 – 5.1 $\mu\text{mol/L}$	BASAL	2.82 \pm 0.75 ^a	2.27 \pm 0.75 ^a	2.35 \pm 0.75 ^b
		INTERMEDIA	4.65 \pm 0.75 ^a	3.97 \pm 0.75 ^a	5.00 \pm 0.75 ^a
		FINAL	6.12 \pm 0.75 ^a	7.92 \pm 0.75 ^a	6.60 \pm 0.75 ^a
		MACHOS			
CREATININA	70 – 88 $\mu\text{mol/L}$	BASAL	105.50 \pm 5.71 ^a	97.25 \pm 5.71 ^a	106.00 \pm 5.71 ^a
		INTERMEDIA	121.50 \pm 5.71 ^a	90.25 \pm 5.71 ^b	115.00 \pm 5.71 ^a
		FINAL	122.00 \pm 5.71 ^a	100.25 \pm 5.71 ^b	116.25 \pm 5.71 ^a
UREA	5.7 – 8.5 mmol/L	BASAL	7.55 \pm 0.45 ^a	6.42 \pm 0.45 ^a	6.22 \pm 0.45 ^b
		INTERMEDIA	8.87 \pm 0.45 ^a	7.15 \pm 0.45 ^b	7.92 \pm 0.45 ^a
		FINAL	10.39 \pm 0.45 ^a	7.80 \pm 0.45 ^b	8.82 \pm 0.45 ^c
ALBUMINA	42 – 50 g/L	BASAL	39.75 \pm 1.04 ^a	41.25 \pm 1.04 ^a	41.75 \pm 1.04 ^a
		INTERMEDIA	35.75 \pm 1.04 ^a	36.50 \pm 1.04 ^a	37.00 \pm 1.04 ^a
		FINAL	35.00 \pm 1.04 ^a	36.75 \pm 1.04 ^a	36.00 \pm 1.04 ^a
FA	363 – 653 U/L	BASAL	382.25 \pm 101.87 ^a	342.50 \pm 101.87 ^a	593.00 \pm 101.87 ^a
		INTERMEDIA	316.25 \pm 101.87 ^a	329.00 \pm 101.87 ^a	498.25 \pm 101.87 ^a
		FINAL	331.75 \pm 101.87 ^a	375.50 \pm 101.87 ^a	678.25 \pm 101.87 ^b
ALT	26 – 48 U/L	BASAL	103.25 \pm 47.17 ^a	138.75 \pm 47.17 ^a	125.50 \pm 47.17 ^a
		INTERMEDIA	139.50 \pm 47.17 ^a	302.75 \pm 47.17 ^b	284.25 \pm 47.17 ^c
		FINAL	117.00 \pm 47.17 ^a	106.00 \pm 47.17 ^a	136.50 \pm 47.17 ^a
BILIRRUBINA	1.7 – 5.1 $\mu\text{mol/L}$	BASAL	2.47 \pm 0.75 ^a	3.37 \pm 0.75 ^a	3.07 \pm 0.75 ^a
		INTERMEDIA	5.77 \pm 0.75 ^a	5.15 \pm 0.75 ^a	6.05 \pm 0.75 ^a
		FINAL	6.27 \pm 0.75 ^a	5.02 \pm 0.75 ^a	7.07 \pm 0.75 ^a

^{a,b,c} literales diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) en renglones.

Para identificar a los individuos que estaban causando la elevación en los niveles de fosfatasa alcalina dentro del grupo del medicamento de prueba, se decidió hacer un diagrama de cajas. Éste se muestra en la **figura 3.3**. Los nombres de los monos que tienen los valores más altos se muestran con un * que indica que hay un valor inusualmente mayor que los demás, llamado *outlier*. En este caso Bayito, que es el mono más joven, es quien tiene este tipo de valor en las mediciones basal y final.

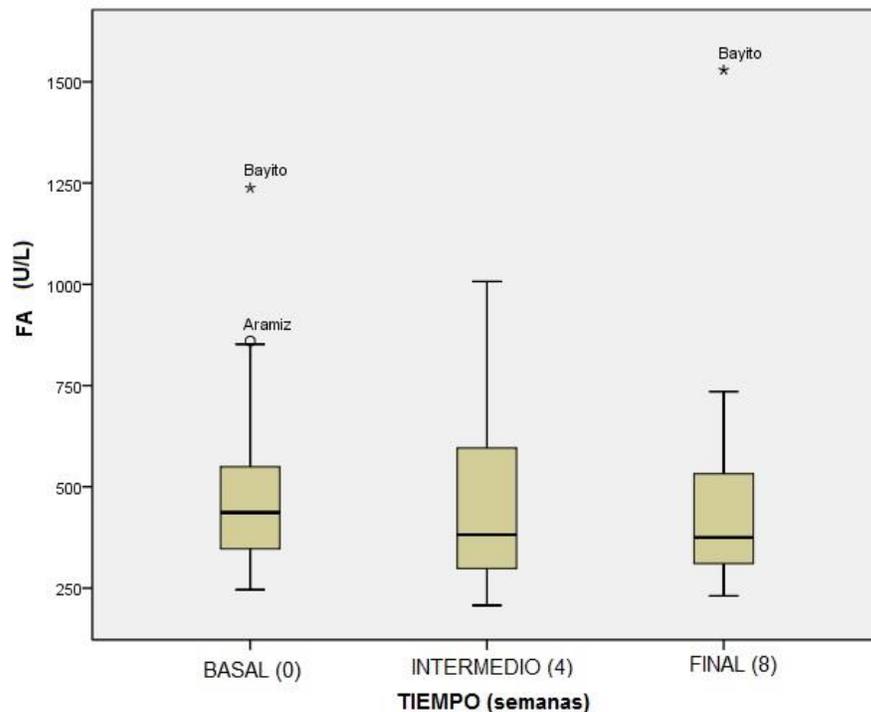


Figura 3.3 *Determinación de fosfatasa alcalina (FA) en el grupo de medicamento de prueba*

Diagrama de caja que registra la fosfatasa alcalina de las tres tomas (basal, intermedia y final) y en ambos sexos, con el que se detectó a los valores *outliers* que elevaron los valores promedio.

3.4.5 Creatina cinasa (CK)

Con objeto de identificar aquellos monos que presentaran los niveles más altos de CK, se realizaron diagramas de caja de todos los monos en el estudio en el tiempo. Los resultados se muestran en la **figura 3.4**. Los nombres de los monos que tienen los valores más altos se muestran con un * que indica que hay un valor inusualmente mayor que los demás, llamado *outlier*.

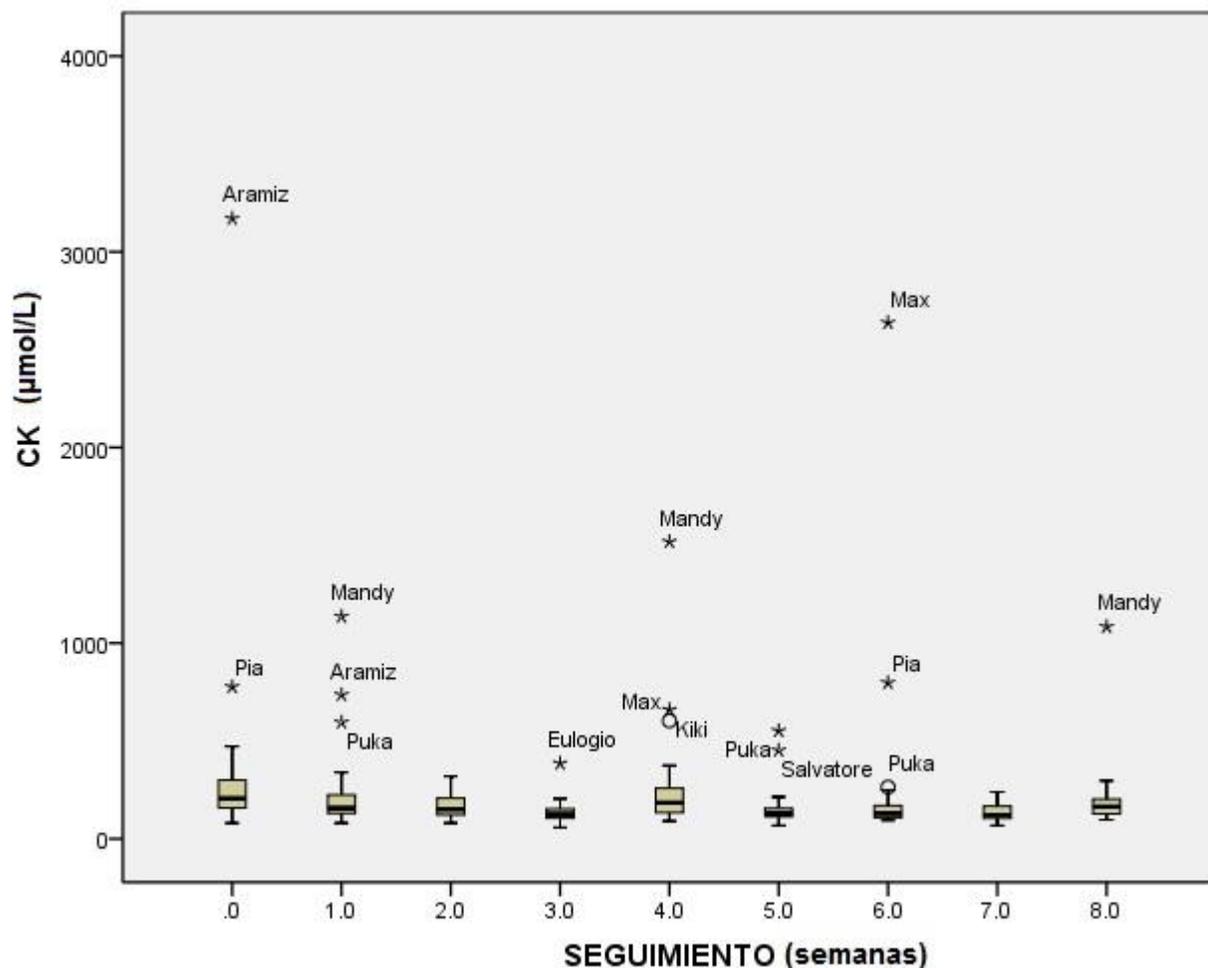


Figura 3.4 Diagrama de cajas de CK de todos los monos, en las 8 semanas del estudio.

3.4.6 Electrocardiograma (ECG)

Se realizó un total de 48 ECG, a cada individuo se le hizo una toma antes de iniciar el estudio y otra al finalizarlo.

En la **figura 3.5** se muestran 2 ejemplos de los ECG obtenidos que presentan un patrón normal. Dos individuos: Puka y Salvatore, presentaron una alteración en el ECG desde la primera toma, éstos se muestran en la **figura 3.6**. Finalmente, tres machos: Hugo, Max y Eulogio, presentaron cambios de polaridad de onda T en la derivada II, entre la toma basal y la final; los ECG de estos tres monos se muestran en la **figura 3.7**. (µmol/L)

Los registros fueron analizados considerando los siguientes puntos: amplitud de las ondas P, Q, R, S y T y la duración del complejo QRS, basado en la derivada II, que es la de mayor utilidad clínica. En el análisis estadístico se observó que en casi todas las amplitudes de onda, el sexo fue un factor que influyó significativamente. No hubo diferencias entre los valores determinados antes y después de los tratamientos en la amplitud de ninguna de las ondas analizadas, ni en la duración del complejo QRS. El tratamiento solamente influyó significativamente en la onda S, aunque los valores no salieron de los rangos normales $P=0.00$ (ver **figura 3.8**) En el complejo QRS, aunque no hubo diferencias significativas en ninguno de los factores, algunos salieron del rango de referencia, comparados con los reportados por de Detweiler (Detweiler, 2010).

Nota: el ECG de la hembra Mina no pudo ser analizado debido a un mal registro asociado a una inadecuada colocación de los electrodos.

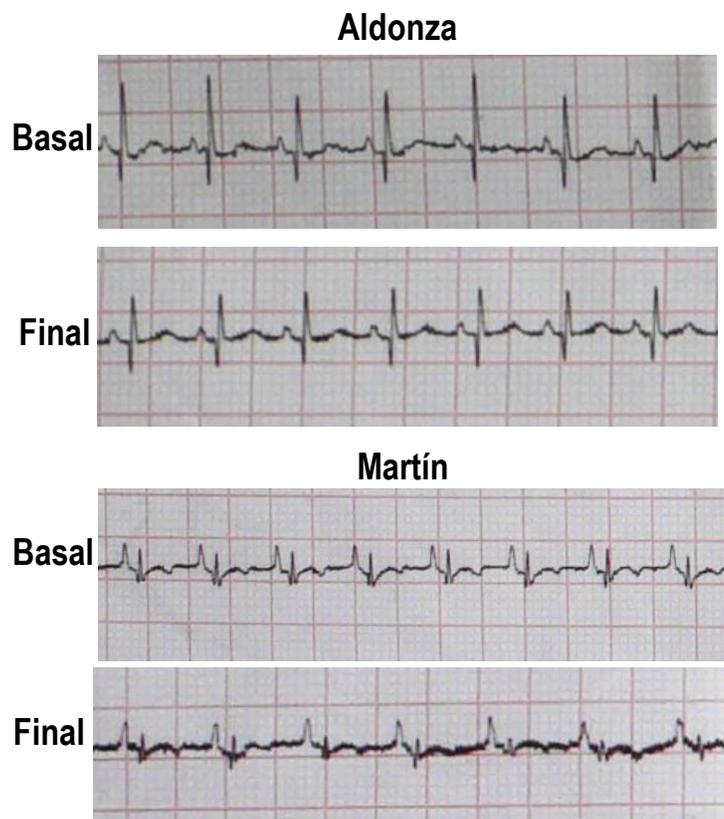


Figura 3.5 ECG con patrón normal

*Gráfico obtenido en la derivada II del ECG de dos monos (una hembra y un macho) en su toma basal y final. Ambos muestran un patrón normal

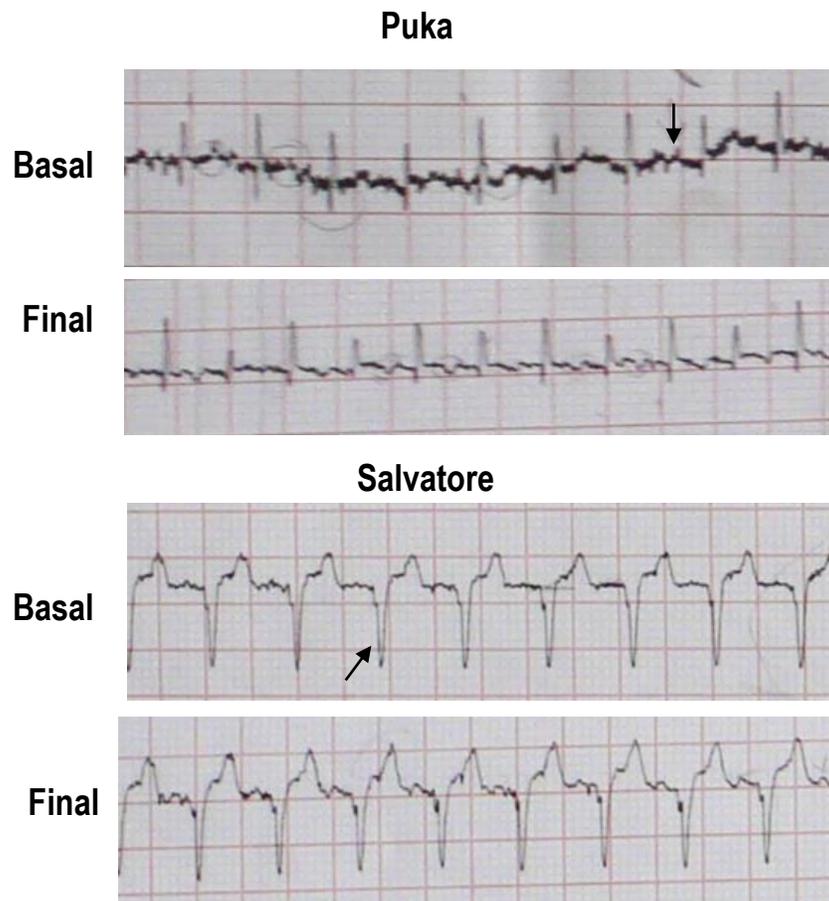


Figura 3.6 ECG con patrón alterado

*Gráfico obtenido en la derivada II del ECG de dos monos (una hembra y un macho) en su toma basal y final. Ambos presentan alteración en su patrón.

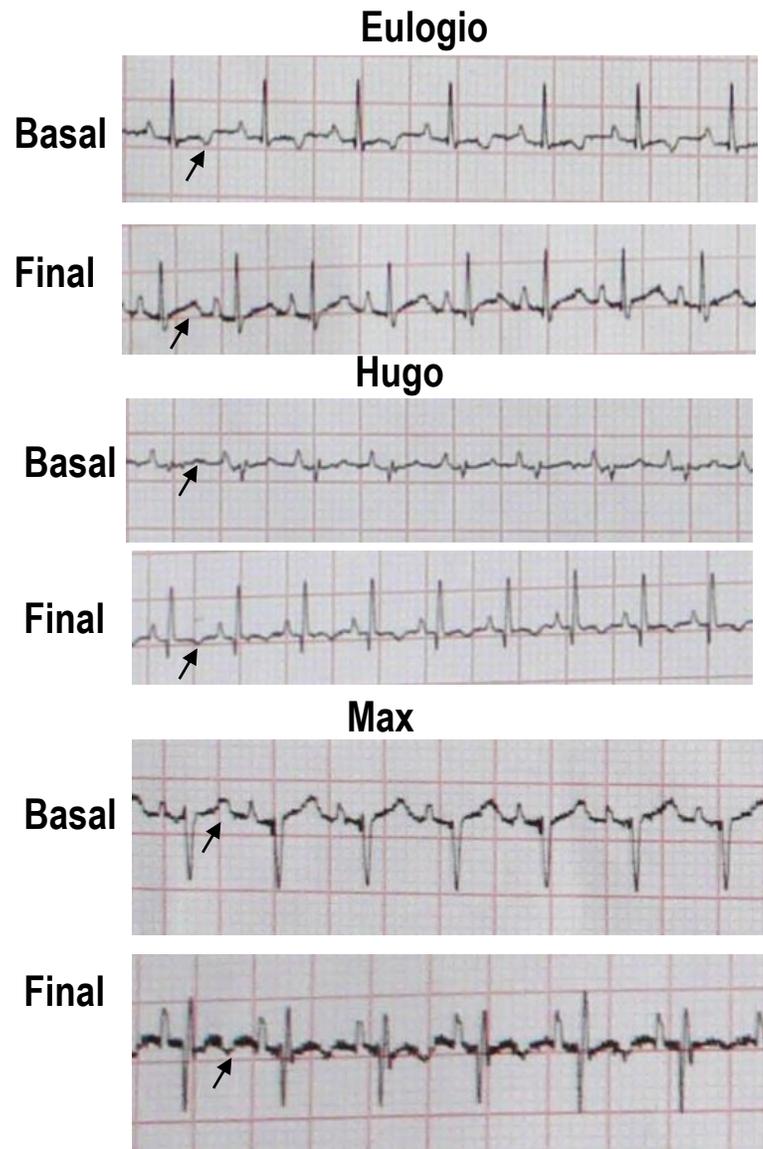


Figura 3.7 ECG con cambios en la polaridad de la onda T.

*Gráfico obtenido en la derivada II del ECG de tres monos que mostraron cambios en la polaridad de la onda T en la toma final, con respecto a su toma basal.

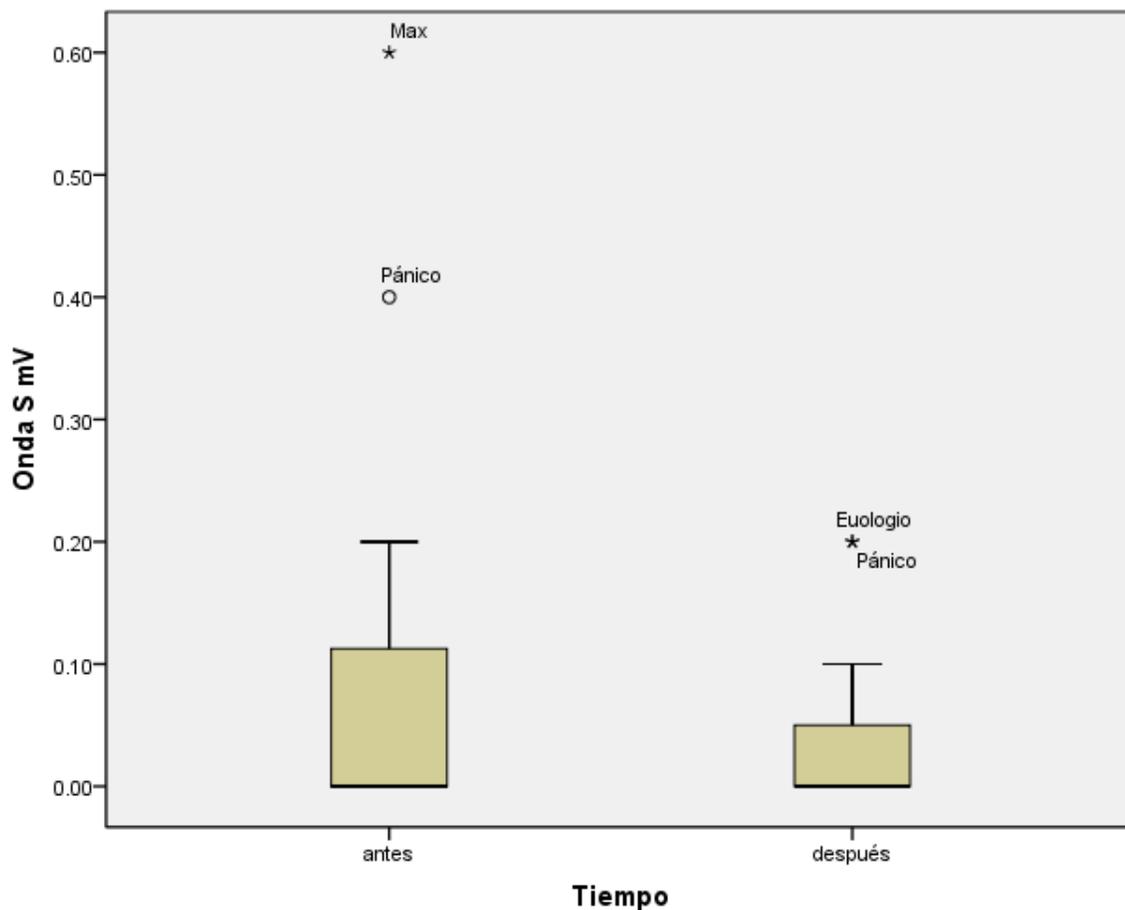


Figura 3.8 Diagrama de caja de la amplitud de la onda S, antes y después del tratamiento.

El diagrama de caja muestra que el tratamiento influyó significativamente en la onda S, al disminuir su valor en la medición posterior al tratamiento. Sin embargo, los valores no salieron de los rangos normales $P=0.00$.

3.4.7 Inmunogenicidad

En el **cuadro 3.6** se muestran las lecturas de densidad óptica, obtenidas con los sueros de mono al incubarlos con las placas fijadas con el medicamento de prueba como antígeno. En el **cuadro 3.7** se muestran las lecturas de densidad óptica, obtenidas con los sueros de mono al incubarlos con las placas fijadas con el medicamento de referencia como antígeno. El suero positivo corresponde a un suero de conejo hiperinmunizado con los medicamentos de prueba y referencia. El suero negativo es un suero de conejo sin inmunizar. La unión no específica corresponde al reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario.

Para establecer el punto de corte se empleó el promedio de las densidades ópticas obtenidas en la toma basal de los monos, más dos desviaciones estándar. El punto de corte para la placa se estableció en 0.14 para la placa fijada con el medicamento de prueba y en 0.11 para la fijada con el medicamento de referencia. Se encontró que la última toma de Lua (tratada con medicamento de prueba) mostró lecturas de densidad óptica de 0.393 y 0.364 (promedio de 0.378) para la placa fijada con medicamento de prueba y de 0.428 y 0.451 (promedio de 0.439) para la placa fijada con medicamento de referencia. Estos se indican con negritas en los **cuadros 3.6 y 3.7**.

Cuadro 3.6 Pruebas de ELISA en monos enfrentados con medicamento de prueba.

Resultados de densidad óptica obtenidos con los sueros de los monos, al enfrentarlos con el medicamento de prueba.

Tratamiento	Nombre	Basal	Basal	Intermedio	Intermedio	Final	Final
Hembras							
Medicamento de referencia	Guma	0.083	0.088	0.083	0.07	0.082	0.077
	Mandy	0.134	0.089	0.105	0.095	0.097	0.101
	Mina	0.135	0.114	0.097	0.105	0.113	0.106
	Aldonza	0.091	0.112	0.107	0.106	0.102	0.12
Placebo	Pía	0.108	0.088	0.087	0.065	0.086	0.077
	Pita	0.112	0.097	0.096	0.096	0.105	0.095
	Puka	0.145	0.137	0.132	0.116	0.127	0.135
	Nissa	0.138	0.127	0.121	0.105	0.108	0.099
Medicamento de prueba	Aramiz	0.13	0.123	0.105	0.101	0.108	0.112
	Lua	0.144	0.135	0.13	0.119	0.393	0.364
	Kiki	0.085	0.092	0.106	0.115	0.096	0.11
	Tita	0.092	0.097	0.101	0.113	0.107	0.105
Machos							
Medicamento de referencia	Bono	0.091	0.074	0.096	0.099	0.109	0.128
	Casio	0.106	0.077	0.095	0.091	0.088	0.095
	Pena	0.109	0.102	0.082	0.073	0.091	0.097
	Salvatore	0.1	0.072	0.09	0.08	0.08	0.078
Placebo	Pánico	0.065	0.076	0.09	0.074	0.072	0.066
	Eulogio	0.105	0.094	0.082	0.07	0.079	0.084
	Jericho	0.085	0.076	0.093	0.074	0.073	0.072
	Martín	0.093	0.114	0.11	0.097	0.099	0.105
Medicamento de prueba	Hugo	0.07	0.078	0.078	0.084	0.08	0.081
	Max	0.102	0.095	0.097	0.083	0.083	0.075
	Pancho	0.09	0.106	0.087	0.088	0.098	0.108
	Bayito	0.088	0.1	0.085	0.092	0.088	0.105

Controles de la prueba					
suero + (1/100)	0.533	0.508	suero - (1/100)	0.108	0.104
suero + (1/100)	0.502	0.505	suero - (1/100)	0.108	0.093
suero + (1/50)	0.615	0.598	suero - (1/50)	0.122	0.112
suero + (1/50)	0.602	0.592	suero - (1/50)	0.109	0.111
Unión no específica	0.049	0.055	Unión no específica	0.053	0.053
Unión no específica	0.062	0.056	Unión no específica	0.054	0.058

Controles de la prueba: el suero positivo corresponde a un suero de conejo hiperinmunizado con los medicamentos de referencia y de prueba. El negativo es un suero de conejo sin inmunizar. La unión inespecífica corresponde al reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario. En la placa se utilizó el medicamento de prueba (Y02-Ak) como antígeno.

Cuadro 3.7 Pruebas de ELISA en monos enfrentados con medicamento de referencia

Resultados de densidad óptica obtenidos con los sueros de los monos, al enfrentarlos con el medicamento de referencia.

Tratamiento	Nombre	Basal	Basal	Intermedio	Intermedio	Final	Final
Hembras							
Medicamento de referencia	Guma	0.097	0.086	0.088	0.084	0.082	0.088
	Mandy	0.089	0.089	0.093	0.083	0.094	0.092
	Mina	0.101	0.068	0.085	0.086	0.082	0.089
	Aldonza	0.1	0.11	0.079	0.079	0.09	0.065
Placebo	Pía	0.09	0.092	0.082	0.079	0.086	0.084
	Pita	0.082	0.081	0.089	0.081	0.085	0.079
	Puka	0.108	0.082	0.095	0.089	0.108	0.109
	Nissa	0.087	0.082	0.087	0.081	0.088	0.091
Medicamento de prueba	Aramiz	0.094	0.083	0.089	0.082	0.094	0.088
	Lua	0.094	0.104	0.105	0.092	0.428	0.451
	Kiki	0.094	0.102	0.091	0.089	0.089	0.085
	Tita	0.077	0.082	0.077	0.088	0.087	0.09
Machos							
Medicamento de referencia	Bono	0.117	0.078	0.089	0.08	0.079	0.078
	Casio	0.104	0.08	0.115	0.088	0.093	0.086
	Pena	0.094	0.073	0.084	0.068	0.091	0.093
	Salvatore	0.113	0.095	0.103	0.094	0.096	0.107
Placebo	Pánico	0.078	0.064	0.084	0.08	0.077	0.079
	Eulogio	0.085	0.084	0.072	0.071	0.075	0.077
	Jericho	0.093	0.081	0.09	0.085	0.09	0.096
	Martín	0.077	0.085	0.084	0.089	0.094	0.09
Medicamento de prueba	Hugo	0.085	0.071	0.091	0.073	0.088	0.089
	Max	0.088	0.076	0.087	0.08	0.076	0.074
	Pancho	0.077	0.082	0.088	0.087	0.08	0.09
	Bayito	0.07	0.071	0.078	0.074	0.097	0.088

Controles de la prueba					
suero + (1/100)	0.359	0.407	suero - (1/100)	0.077	0.083
suero + (1/100)	0.334	0.38	suero - (1/100)	0.074	0.082
suero + (1/50)	0.435	0.469	suero - (1/50)	0.091	0.1
suero + (1/50)	0.412	0.485	suero - (1/50)	0.082	0.099
Unión no específica	0.057	0.051	Unión no específica	0.061	0.059
Unión no específica	0.064	0.056	Unión no específica	0.07	0.063

Controles de la prueba: el suero positivo corresponde a un suero de conejo hiperinmunizado con los medicamentos de prueba y de referencia. El negativo es un suero de conejo sin inmunizar. La unión inespecífica corresponde al reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario. En la placa se utilizó el medicamento de referencia (Herceptin®) como antígeno.

3.5 Discusión

Los monos registraron una baja de peso durante el desarrollo del estudio; sin embargo, no se atribuyó al tratamiento sino al ayuno que se realizaba para evitar complicaciones durante la sedación, y al estrés ocasionado por el manejo.

Con respecto a los hemogramas, se encontraron diferencias significativas en algunos analitos, las cuales no tienen relevancia debido a que ninguna de éstas está asociada al tratamiento. Dichos hallazgos fueron eventos aislados que no muestran consistencia de muestreo a muestreo y carecen de relevancia fisiológica.

Al analizar los valores de las bioquímicas sanguíneas (**cuadro 3.5**), se observó que los valores medios de creatinina del grupo placebo en las hembras resultaron más altos en las mediciones intermedia y final que en los demás grupos y son superiores a los valores de referencia. Este hallazgo puede estar influenciado por el estado de hidratación de los animales y por condiciones propias del grupo, puesto que desde la determinación basal, la media de concentración de creatinina, fue mayor que la de los grupos del medicamento de prueba y de referencia. Los niveles medios de urea, en la medición final del grupo de medicamento de prueba, fueron los más altos, además de ser mayores que los valores de referencia. Sin embargo, debido a que este hallazgo no se acompaña de incremento de creatinina, se descarta la posibilidad de un efecto tóxico renal; dicho incremento se puede asociar a estados de deshidratación subclínica y por lo tanto, a ligera disminución en la tasa de filtrado glomerular. Por otro lado, los niveles de bilirrubina se elevaron por encima de los valores de referencia al final del estudio, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos analizados, por lo tanto, este hallazgo no tiene relevancia.

En los machos la creatinina presentó valores por encima de los de referencia en todos los grupos, sin embargo, exceptuando al grupo placebo en su medición intermedia (más bajo que todos los demás) no se observaron diferencias significativas en este analito. Los niveles de urea, a pesar de mostrar diferencias significativas en algunas mediciones, estuvieron dentro de los valores de referencia, exceptuando al grupo tratado con el medicamento de referencia, que tuvo valores más altos en las mediciones intermedia y

final, además que fueron significativamente más altos que en el grupo tratado con el medicamento de prueba y el placebo. Este cambio se puede explicar de la misma forma que en el caso de urea para las hembras. La fosfatasa alcalina es otro analito que, en machos, tuvo valores medios más altos; el grupo tratado con el medicamento de prueba rebasó los límites de referencia y fue significativamente más alto que los otros grupos. Vale la pena hacer notar que la media de la fosfatasa alcalina en dicho grupo se encontró más alta que el resto de los grupos desde las determinaciones basales. Lo anterior se explica por la presencia de un animal en crecimiento: Bayito (**figura 3.3**), esta condición fisiológica puede incrementar la fosfatasa alcalina pero en su isoenzima ósea. Se descarta la posibilidad de daño biliar o colestasis debido a que este hallazgo no se acompaña de diferencias significativas en ALT o bilirrubinas.

El incremento de ALT sobre el valor de referencia en todos los individuos de todos los grupos, responde a condiciones particulares de la población, probablemente alimentación o manejo, pero en cualquier caso sería un hallazgo normal para esta población.

Con respecto a la CK, se encontraron incrementos marcados en algunos individuos (**figura 3.4**), sin embargo, dichas alteraciones no fueron constantes, consistentes o progresivas, por lo tanto, no reflejaban la posibilidad de daño cardiaco, razón por la cual en ningún caso fue necesario hacer electrocardiogramas adicionales o determinación de troponinas. El incremento que se presentó en algunos monos puede corresponder a las condiciones de manejo que implican un importante esfuerzo muscular en el momento de captura, o bien, a pequeñas lesiones producto de riñas entre los individuos.

Al realizar los electrocardiogramas se identificaron a dos individuos que presentaron alteración en el estudio, sin embargo, ésta se vio desde la toma basal y se mantuvo sin cambios en la toma final. Por lo tanto, las alteraciones encontradas no son atribuibles a la administración del fármaco. Uno de estos casos corresponde a la hembra identificada como Puka, quien presentó complejos QRS alternados de mayor y menor tamaño a lo largo de todo el registro en la derivada II. El otro caso corresponde al macho Salvatore, que presentó un aparente bloqueo de rama.

Tres individuos machos, identificados como Hugo, Max y Eulogio, presentaron cambio de polaridad en la onda T. En los primeros dos, la onda pasó de ser positiva en el ECG basal

a negativa en el ECG final; en el caso de Eulogio el cambio se dio de negativo a positivo. En la especie *Macaca mulatta* la polaridad de la onda T puede ser positiva o negativa, sin embargo los cambios de la polaridad en un mismo individuo deben ser explicados. La onda T corresponde al registro de la re-polarización ventricular. Se requieren más estudios para entender los mecanismos anormales de re-polarización en *Macaca mulatta* que podrían reflejarse en la inversión de la onda T. Sin embargo, la inversión de esta onda, puede asociarse con causas benignas como el efecto de fármacos autónomos o a un estado de hiperventilación, ya que los registros obtenidos en el mono se asemejan a los de humano en condiciones de miedo, ansiedad, o emociones intensas. Por lo que se ha denominado por muchos, un “electrocardiograma funcional” (Gill, 2000).

En el análisis estadístico se determinó que no hubo cambios en la amplitud de las ondas P, Q, R, T, ni en la duración del complejo QRS después de aplicar los tratamientos, por lo que podemos decir que estos no tienen ningún efecto sobre dichas variables.

El análisis estadístico mostró un cambio significativo en la onda S ($P=0.00$). Dicho cambio consistió en la disminución de la amplitud de esta onda entre el registro basal y el final (pasó de 0.20 a 0.10 mV), en los grupos: machos tratados con medicamento de prueba; y tanto hembras como machos tratados con placebo. Ahora bien, un cambio patológico sugerido por esta onda se reflejaría con un incremento en su amplitud, y no en su disminución, como en este caso. Además, a pesar de los cambios en los valores, pre y post tratamiento, éstos siempre se mantuvieron dentro de los rangos normales de la especie (0.0 – 0.4 mV). El análisis de la onda S por sí sola no es preciso, por lo que se analiza en conjunto con las demás ondas del complejo QRS. Este complejo provee información de la despolarización ventricular, una alteración en su duración sugiere una patología asociada a los ventrículos.

Cabe mencionar que algunos de los principales efectos cardiopáticos secundarios por el medicamento de referencia son la cardiomiopatía dilatada y la deficiencia ventricular izquierda. Estas alteraciones se apreciarían con un patrón muy evidente en el ECG, como complejos QRS ensanchados (mayor duración), lo que no se encontró en ninguno de los monos del estudio. Cuando se presenta una alteración de este tipo, se debe proceder a realizar un estudio de imagen pues sólo con éste se puede confirmar un cambio en el tamaño del corazón. Esto no fue necesario, pues los casos en los que se detectaron

alteraciones sugerentes a una patología (Puka y Salvatore) se presentaron desde la toma basal.

Con respecto a la inmunogenicidad, se encontró que la última toma de Lua (tratada con el medicamento de prueba) mostró un resultado positivo en la prueba de ELISA, en una dilución del suero 1:10. Lo anterior indica que el medicamento de prueba resultó inmunogénico en uno de los ocho animales tratados, después de haber recibido ocho aplicaciones del fármaco. Cabe destacar que la mayoría de los anticuerpos monoclonales empleados como terapia contra cáncer en humanos han mostrado cierto grado de inmunogenicidad en algunos pacientes (Park et al., 2009, Hansel et al., 2010). En el caso específico del medicamento de referencia en estudio, también se ha reportado inmunogenicidad en pruebas de dosis repetidas empleando monos *cynomolgus* (EMA, 2005). Es importante destacar que al tratarse de anticuerpos humanizados, existe una mayor probabilidad de que los monos generen una respuesta inmune contra éstos que la que presentarían los pacientes humanos. Por lo anterior, este hallazgo debe tomarse con cautela y se sugiere avalar estos resultados con estudios de vigilancia epidemiológica en humanos.

3.6 Conclusiones

El estudio de toxicidad a dosis múltiples no arroja diferencia entre el medicamento de referencia y el de prueba, apuntando a que son biocomparables. Encontrándose que en ambos casos fue bien tolerado y no hubo evidencia de toxicidad sistémica ni cardíaca en monos (*Macaca mulatta*).

El medicamento de prueba generó inmunogenicidad en uno de los ocho monos de dicho grupo.

4. ESTUDIOS DE EFICACIA: EFICACIA *IN VIVO*

4.1 Introducción

Los estudios de eficacia buscan demostrar la actividad del fármaco. En el caso de los anticuerpos monoclonales las pruebas que deben emplearse son aquellas que demuestren la especificidad de unión a su molécula blanco; así como los efectos biológicos que dicha unión pueda acarrear. Estas pruebas buscan simular el ambiente en un organismo humano, por lo que se utilizan animales como modelos de experimentación.

El modelo de experimentación utilizado para este estudio fue ratones atímicos desnudos Foxn 1 nu, descubiertos en 1962. Esta línea de ratón se caracteriza por presentar mutación autosómica recesiva en el locus nu del cromosoma 11, aplasia del timo, alopecia, deficiencia de linfocitos T, función normal de linfocitos B, falta de generación de células citotóxicas efectoras y aceptar xenotrasplantes. Actualmente es uno de los modelos animales más utilizados para investigación en oncología e inmunología (HarlanLaboratories, 2009).

La línea celular SKBR-3 utilizada para realizar el modelo de xenotrasplatación murino, es una línea de cáncer de mama humano caracterizada por sobreexpresar el receptor HER-2 y por ser capaz de desarrollar tumores pobremente diferenciados en ratones inmunocomprometidos. Estas células son comúnmente utilizadas como controles positivos en estudios sobre el receptor HER-2, además, son útiles como modelo preclínico para agentes terapéuticos cuyo blanco de acción es este receptor. La línea celular SKBR-3 fue establecida en el año 1970, proveniente de una efusión pleural de una mujer caucásica de 43 años de edad con cáncer de mama (MSKCC, 2014).

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica fundamental en los estudios de eficacia *in vivo* ya que permite detectar diferentes moléculas que aportan información sobre la actividad celular.

La IHQ es un estudio histopatológico que se basa en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (conjugado). Dicho conjugado se une de manera específica al antígeno presente en un tejido, resultando en una reacción antígeno-anticuerpo que, agregando el

sustrato correspondiente, puede visualizarse como depósitos de cromógeno con un microscopio óptico. Esta prueba tiene la ventaja de que al aplicarse sobre secciones tisulares permite la localización microanatómica del antígeno y su correlación con la morfología del tejido, lo que puede proporcionar información valiosa para un diagnóstico más certero. La inmensa mayoría de técnicas de IHQ pueden aplicarse a tejidos incluidos en parafina con buenos resultados, siempre que la fijación tisular, su procesamiento e inclusión se realicen correctamente (Javois, 2010, Buys, 2007).

A continuación se describen brevemente las moléculas detectadas a través de esta técnica en el estudio.

HER-2. La IHQ es la técnica más usada para detectar y semicuantificar la proteína HER-2 sobre la membrana celular. La sobreexpresión del receptor, incrementa la receptividad a diferentes factores de crecimiento, por lo que está asociada a un mal pronóstico. El HER-2 es el blanco terapéutico del medicamento de referencia y de prueba por lo que, la sobreexpresión del receptor es determinante para la toma de decisión en la administración del medicamento (González, 2007).

CD31. Las neoplasias dependen, entre otros factores, del crecimiento continuo de vasos sanguíneos (angiogénesis tumoral) para su desarrollo. CD31 es una glucoproteína de adhesión transmembranal que se expresa en todo el endotelio de arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares. Dada la reactividad con el endotelio vascular, se ha considerado al anti-CD31 como un anticuerpo útil para marcar vasos sanguíneos (Ortiz-Hidalgo, 1994). Para su interpretación se cuenta el número de vasos sanguíneos positivos, observados en un campo de 400X y se clasifican como 0 a 33 vasos, 34 a 67 o de 68 a 100 (Ortiz-Hidalgo, 1994).

IgG. El medicamento de referencia y el de prueba son anticuerpos monoclonales humanizados, por lo tanto, la identificación intracelular de anticuerpos IgG humanos en las células tumorales es una forma indirecta de demostrar que el tratamiento, ya sea con el innovador o con el biocomparable, fue efectivo al unirse a su molécula blanco HER-2.

Ki67. La expresión de la proteína humana Ki-67 está asociada con la proliferación celular debido a que está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y la mitosis), pero está ausente en la fase G0, lo que la hace un excelente marcador de proliferación. El porcentaje de células tumorales positivas a Ki-67 a menudo se correlaciona con el curso clínico de la enfermedad lo que le ha tomado una gran importancia en la determinación del pronóstico en pacientes con cáncer (Scholzen and Gerdes, 2000).

TUNEL. La apoptosis es un factor que participa en la patogénesis de numerosas enfermedades, entre ellas, el cáncer (Panizo, 1997). Es una forma activa de muerte celular regulada como respuesta a señales moleculares externas o internas. A diferencia de la necrosis celular, la apoptosis es un proceso activo que requiere de energía y de la expresión de ciertos genes. La expresión morfológica de la apoptosis se caracteriza por la condensación de la heterocromatina nuclear, la disminución del tamaño celular y la condensación citoplasmática, lo que da lugar a la imagen morfológica que se conoce como cuerpos apoptóticos. Sin embargo, es un proceso que ocurre con tanta rapidez que es difícil observarlo y cuantificarlo utilizando únicamente la morfología, por lo que se emplea la técnica de TUNEL (TdT- mediated dUTP Nick end labelling), que es selectiva para células en apoptosis, ya que éstas presentan mayor grado de fragmentación del DNA. El fundamento de esta técnica justamente consiste en la detección de la ruptura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis, en secciones de tejido fijadas en parafina. Los fragmentos de DNA se marcan mediante la incorporación catalítica de 16-dUTP marcado en los extremos libres por medio de una enzima transferasa deoxinucleotidil terminal (TdT) (Panizo, 1997). La interpretación de los resultados de la técnica de TUNEL se basa en la valoración de la intensidad del color producto de la reacción enzimática en los núcleos de las células tumorales. Los resultados se reportan en un escala de 0 a 3+ (Panizo, 1997).

4.2 Objetivos

Objetivo general:

Evaluar y comparar la farmacodinamia del medicamento de prueba y el de referencia, para determinar si son biocomparables.

Objetivos particulares:

- a) Comparar la capacidad de reducir el tamaño tumoral del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplación, para demostrar si éstos son biocomparables.
- b) Comparar la capacidad anti angiogénica *in vivo* del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplación, para demostrar si éstos son biocomparables.
- c) Comparar la capacidad de unión a HER-2 del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplación, para demostrar si éstos son biocomparables.
- d) Comparar la capacidad de inducir apoptosis del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplación, para demostrar si éstos son biocomparables.
- e) Comparar la capacidad de inhibir la proliferación celular del medicamento de prueba con el medicamento de referencia, empleando un modelo murino de xenotrasplación, para demostrar si éstos son biocomparables.

4.3 Metodología

4.3.1 Productos de prueba:

Los productos evaluados fueron el medicamento de prueba, medicamento de referencia y excipiente (placebo).

- El medicamento de prueba se recibió como polvo liofilizado homogéneo de color blanco a amarillo pálido con formación de pastilla.

- El medicamento de referencia se recibió en frasco ampula con 440 mg de trastuzumab en polvo y frasco ampula con diluyente, conteniendo 220 mg de alcohol bencílico y 20 mL de agua inyectable.
- El excipiente del medicamento de prueba se utilizó como placebo.
-

4.3.2 Recepción de los animales

El día 20 de febrero del 2013 se recibieron 32 ratones hembras Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu (Harlan México, S.A. de C.V.) de 5 semanas de edad. El contenedor se manejó dentro de un gabinete de seguridad biológica clase II (CF-EA-01), ambos fueron desinfectados con alcohol al 70%. En total se formaron 6 grupos, cada uno de ellos se colocó en microaisladores estériles con las siguientes dimensiones: 18.4 x 29.21 x 12.7cm (4 a 5 ratones/jaula). Se les proporcionó alimento Harlan Teklad 2018S para ratón/rata y agua purificada por ósmosis inversa *ad libitum*.

Los animales se alojaron bajo condiciones ambientales controladas en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM, las cuales incluyen extracción e inyección de aire con 18 recambios por hora. Éste se realizó mediante filtros HEPA filtrándose partículas hasta de 3 μm en el aire. La temperatura en el cuarto experimental se mantuvo en $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, los ciclos de luz oscuridad fueron de 12/12 h.

Se empleó cama HT Celulosa (papel blanco comprimido), para facilitar la observación de hematuria, diarrea o melena y dar mayor comodidad. El trabajo contó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM y se siguieron sus lineamientos de reconocimiento del dolor como criterio para la terminación anticipada de un experimento por razones humanitarias.

4.3.3 Cultivo celular y preparación del implante

Se utilizaron células SKBR-3. El cultivo celular se realizó en condiciones asépticas en un gabinete de seguridad. Se usó medio RPMI 1640 (Marca GIBCO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (marca GIBCO). Se hicieron recambios de medio cada tercer día hasta la xenotrasplante.

Se realizaron los cálculos necesarios para conocer el número de células que se tenían a un 80% de confluencia en el frasco de cultivo. La cuenta de células fue de 75 millones. Se calculó la dilución correspondiente para que en cada inoculación de 0.3 mL existiera una cantidad aproximada de 2.5 millones de células. El vehículo de inoculación fue medio de cultivo celular suplementado RPMI 1640 (Marca GIBCO). El implante tumoral se inoculó por vía subcutánea en el flanco izquierdo del animal con jeringas de insulina (día de implantación: 26 de febrero del 2013).

4.3.4 Reconstitución de los medicamentos.

La reconstitución de los medicamentos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del patrocinador señaladas en el documento: Manejo de medicamento para estudios pre-clínicos del día 30 de Agosto de 2012.

Medicamento de referencia (Trastuzumab 440 mg):

El medicamento se reconstituyó con su respectivo diluyente para obtener una concentración final de 21 mg/mL. El volumen a administrar se calculó de acuerdo al peso de cada animal. La dosis en la primera administración fue de 20 mg/kg y todas las posteriores de 10 mg/kg vía intraperitoneal.

Medicamento de prueba:

El medicamento y placebo se reconstituyeron de forma independiente en 7.2 mL del diluyente. El volumen reconstituido para cada uno fue de 7.4 mL y la concentración final de 21 mg/mL (igual a la del medicamento de referencia). El volumen a administrar se calculó de acuerdo al peso de cada animal. La dosis de la primera administración fue de 20mg/kg y todas las posteriores de 10 mg/kg vía intraperitoneal.

4.3.5 Desarrollo tumoral

Los ratones se revisaron diariamente buscando cambios en el sitio de implante tumoral. Al tercer día post implante, en algunos de los animales se apreció una zona de color blanquecino, indicando la aparición del tumor pero aún no era medible. Al cuarto día se identificaron a los ratones con muescas en las orejas y los tumores se midieron por primera vez. Se registraron las medidas de diámetro mayor (largo) y diámetro menor

(ancho). En los casos en que se presentaron tumoraciones dobles se registraron las medidas de ambos de manera independiente. Con estos valores se calculó el volumen tumoral, utilizando la fórmula que se describe en el análisis estadístico.

Los animales numerados del 1 al 32 mediante muescas en las orejas, se asignaron a cada uno de los tratamientos: medicamento de prueba, medicamento de referencia o placebo (excipiente del medicamento de prueba). Los ratones fueron incluidos en alguno de los tres grupos de manera aleatoria sólo hasta que el volumen tumoral fuera mayor a 100 mm³. Para distribuirlos aleatoriamente, cada día (4, 5, y 6 de marzo del 2013) se identificó a los animales que ya cumplían con el volumen tumoral, y con un sistema al azar por calculadora se repartieron en los tres grupos de tratamiento. Los primeros cuatro números arrojados se colocaron en el grupo de medicamento de prueba, los siguientes cuatro en el de medicamento de referencia y los siguientes en el grupo de placebo. Tres animales que no desarrollaron tumor (25, 26 y 28), se repartieron uno en cada grupo. Los animales se trataron de manera desfasada, es decir que cada uno de los tres grupos incluía animales con diferentes días de inicio de tratamiento, pues el tumor alcanzó el tamaño esperado a diferentes tiempos. Esto no modificó el protocolo realizado. En la **figura 4.1** se muestra el desarrollo tumoral.



Figura 4.1 *Desarrollo tumoral*

Se ilustra el desarrollo del tumor después de implantar células SKBR-3 en ratones Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu, en la región inguinal izquierda.

En el **cuadro 4.1** se muestran los diferentes días de inicio de tratamiento, el tratamiento que recibió cada uno de los grupos y la distribución de animales por tratamiento.

Cuadro 4.1 *Distribución de animales por grupo de tratamiento*

Grupo	No. de Identificación Día 0: (04/03/13)	No. de Identificación Día 0: (05/03/13)	No. de Identificación Día 0: (06/03/13)	No. de Identificación Día 0: (07/03/13)
Prueba	11, 29, 30, 32	8, 19, 20, 25	4, 16	
Referencia	3, 10, 22, 31	5, 17, 18, 26	9, 21	
Placebo	1, 14, 23, 27	12, 13	15, 24, 28	2

Nota: los ratones 6 y 7, no desarrollaron el tumor, razón por la cual no fueron incluidos en ningún grupo. Los ratones 25 y 26 no presentaban un tumor visible y medible, sin embargo se palpaba una masa en cavidad abdominal, evidenciando que el tumor estaba presente pero al interior de la cavidad.

Independientemente del día de inicio del tratamiento se llevó a cabo el mismo protocolo en todos los animales: diariamente se pesaron, se registraron medidas de diámetro mayor y diámetro menor, así como el cálculo del volumen tumoral. El tratamiento se administró cada tercer día. En la **figura 4.2** se muestra la medición del tumor.



Figura 4.2 *Medición del tumor con vernier*

4.3.6 Necropsia e histopatología

Para la eutanasia los animales fueron colocados en una cámara de CO₂ a los 7 días de iniciado el tratamiento. La necropsia se realizó inmediatamente después de la eutanasia. Todos los animales fueron sometidos a una necropsia completa, que incluyó una revisión externa con medición del implante tumoral y disección para su posterior fijación. 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, se colectaron muestras de cerebro, pulmón, corazón, hígado, bazo, riñones, intestino delgado, intestino grueso y linfonodos; posteriormente se fijaron en un frasco individual con formalina al 10% amortiguada durante 48 horas. Para determinar el tamaño tumoral, las masas tisulares se midieron por su largo, ancho y fondo.

Para el análisis histopatológico, los órganos, una vez fijados en formol, se procesaron en un Histoquinet Leica, el cual aclara, impregna y parafina los tejidos al sumergirlos automáticamente por un periodo de 20 a 24 horas. La inclusión en parafina se realizó en un incluidor (marca Leica), para posteriormente realizar cortes de 3 a 4 micras de grosor utilizando un microtomo (marca Leica). 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.

4.3.7 Inmunohistoquímica

Cada grupo tratado estuvo conformado por 10 ratones (**cuadro 4.1**). Sin embargo, en el grupo del medicamento de prueba, sólo se trabajaron las muestras de nueve animales debido a que uno de los ratones (número 20) murió y presentó cambios autolíticos severos que impidieron obtener una muestra viable de tejido.

Para la inmunohistoquímica se realizaron cortes de 3 a 4 micras de grosor del tejido tumoral de células SK-BR3 implantadas y se montaron en portaobjetos electrocargados. Las muestras se desparafinaron en xilol y se hidrataron en alcohol etílico a concentraciones decrecientes hasta agua destilada (xilol, etanol 100%, etanol 96%, etanol 70%, etanol 50% y agua destilada). A continuación se realizó el desmascaramiento antigénico de las muestras en solución buffer de citrato de sodio a 0.1M, pH 6 con Tween 20 al 0.1%, en la olla de presión (OP-IHQ-01) durante 10 min a 121°C y 15 lb de presión. Se dejaron enfriar 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con Tris-buffer (pH 7.4) con Tween 20 durante 5 min. Finalmente se adicionó peróxido de hidrógeno al 3% durante cinco minutos con el fin de bloquear las peroxidasas endógenas. Las muestras se volvieron a lavar con Tris- buffer (pH 7.4) con Tween 20 durante 5 min.

Las muestras de tejido fueron incubadas, en forma independiente, con el anticuerpo primario (HER-2 Spring bioscience, CD31 Dako, Ki67 Bio Sb, IgG Dako) a la concentración indicada por el fabricante durante 30 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Se repitió el lavado de las muestras con Tris-buffer (pH 7.4) con Tween 20 durante 5 min. A continuación las muestras se incubaron con el anticuerpo

secundario biotinilado (Spring bioscience) por 15 min en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

Después se adicionó la estreptavidina conjugada con peroxidasa (Spring bioscience) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Nuevamente se lavaron con Tris-buffer (pH 7.4) con Tween 20 durante 5 min.

Las inmunorreacciones fueron reveladas con el cromógeno previamente preparado (Diaminobencidina Spring bioscience) durante 5 min y se observaron periódicamente al microscopio hasta tener una reacción óptima. Posteriormente fueron lavadas con Tris-buffer (pH 7.4) con Tween 20.

Por último, las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina de Meyer (Dako) durante 3 min a temperatura ambiente y se lavaron con agua corriente. Posteriormente fueron deshidratadas en alcohol etílico a concentraciones crecientes hasta xilol (tren de tinción inverso). Finalmente fueron montadas con resina (Entellan) para su observación al microscopio de luz (MO-IHQ-01) para su interpretación.

Para la técnica de TUNEL se llevó a cabo el mismo procedimiento hasta el desenmascaramiento de antígenos seguido de la adición de la reacción de TUNEL. Las muestras se incubaron a 37°C por 60 minutos en cámara húmeda y en la oscuridad. Se lavaron con Tris-buffer con Tween 20 (pH 7.4) por 5 min. Posteriormente se les adicionó el convertidor POD y se incubaron a 37°C por 30 min. Nuevamente se lavaron con Tris-buffer con Tween 20 (pH 7.4) por 5 min. Se prosiguió con la adición de la solución de sustrato (Diaminobencidina). Finalmente fueron montadas con resina (Entellan) para su observación e interpretación en el microscopio de luz (MO-IHQ-01).

La interpretación de los resultados de IHQ se basó en la valoración de la intensidad de la inmunorreacción de las membranas celulares y el porcentaje de las células tumorales positivas. Los resultados se reportaron en un escala de 0 a 3+ (Buys, 2007). Esta escala tiene equivalencia con la sobreexpresión génica. Cuando las células tienen menos de 20,000 receptores no muestran inmunomarcación (negativo, 0); si tienen cerca de 100,000 receptores muestran inmunomarcación **débil** de la membrana con menos del

10% de las células con marcación completa (positivo, 1+); cuando tienen 500,000 receptores muestran inmunomarcación **moderada** en la membrana en más de 10% de las células (positivo, 2+), y si tienen aproximadamente 2,300,000 receptores muestran inmunomarcación **completa e intensa** de la membrana en más del 10% de las células (positivo, 3+). Esta escala de interpretación se utiliza para todos los marcadores de IHQ, especificando el sitio celular de inmunomarcación (membrana, citoplasma o núcleo). (Buys, 2007).

4.3.8 Análisis estadístico

El análisis del tamaño tumoral *in vivo* se realizó por medio de un modelo mixto lineal (Gill, 2000), con la variable intrasujeto muestreo (días) y tratamiento (medicamento de referencia, medicamento de prueba y placebo) como factor inter sujeto, seguida por un análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni (Park et al., 2009). El método de análisis fue de máxima verosimilitud, éste se eligió debido a que la variable no tenía una distribución normal. Este método es adecuado cuando el de cuadrados mínimos no puede utilizarse por la falta de normalidad. Debido a que hubo pérdida de individuos durante el estudio, se decidió utilizar el Modelo Mixto, ya que estima los parámetros de cada tiempo, aunque se tengan valores perdidos. En el análisis no se añadió la variable 'número de tratamientos' debido a que este número estaba relacionado con la muerte del ratón, y esta pérdida ya se estima en el Modelo Mixto (Gill, 2000). Se muestran medias \pm error estándar e intervalos de confianza del volumen tumoral, en todos los tiempos y tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico IBM SPSS 19[®].

En el análisis del volumen tumoral *ex vivo* (cm³) se efectuaron las pruebas de Shapiro Wilks para conocer si los datos se distribuían de forma normal y la prueba de Levene para saber si existía homogeneidad de varianzas entre tratamientos (Shapiro, 1990, Yitnosumarto, 1986). Con base en esto se decidió llevar a cabo un análisis de varianza de una vía. Los resultados se muestran con medias y significancias, además de gráficas de medias y desviaciones estándar para cada tratamiento.

Respecto a las pruebas de inmunohistoquímica, éstas se realizaron con fines descriptivos, por lo cual no cuentan con un análisis e interpretación estadística.

4.4 Resultados

4.4.1 Desarrollo tumoral

A partir del día 11 post implantación fue muy evidente el mal aspecto de los animales, algunos presentaron ascitis así como disminución en la actividad física. Al tacto se percibía una disminución de la temperatura corporal. En varios tumores se observaron zonas muy irrigadas, con necrosis y enrojecimiento. El día 13 post implantación se registraron las primeras muertes, todas atribuibles al elevado crecimiento tumoral y a su infiltración en cavidad abdominal. Del grupo del medicamento de prueba murieron los ratones 20 y 29, del grupo del medicamento de referencia el 21 y el 31 y de los que recibieron placebo, el 2 y el 15. También murió el ratón 6 que no recibió ningún tratamiento. De los animales antes mencionados el 2, 15 y 29 acababan de morir cuando se revisaron, el resto habían muerto con anterioridad y en su mayoría presentaban signos de autólisis, sin embargo, esto no impidió su análisis.

Se decidió aplicar la eutanasia a todos los ratones (aproximadamente 14 días después de la implantación del tumor) entre el día 6 y 7 de tratamiento, debido al mal estado que mostraban. Por lo tanto, algunos animales recibieron 4 administraciones del fármaco: los días 0, 2, 4 y 6. Estos corresponden a los números 11, 30 y 32 del grupo del medicamento de prueba, el 3, 10 y 22, del medicamento de referencia y al 1, 14, 23 y 27 del grupo placebo. El resto de los animales sólo recibió tratamiento los días 0, 2 y 4.

Los animales muertos o sacrificados (utilizando cámara de CO₂), fueron colocados en frascos estériles identificados con el número del ratón y se llevaron inmediatamente al departamento de Patología de la FMVZ-UNAM.

4.4.1.1 Análisis estadístico

En el **cuadro 4.2** se presenta el análisis de Máxima Verosimilitud del modelo. Tanto el tiempo ($P= 0.001$) como el tratamiento ($P=0.019$) mostraron un efecto significativo en el volumen tumoral, mientras que la interacción no fue significativa ($P=0.996$). Esto quiere decir que la suma de todas las medias del tamaño de tumor independientemente del tiempo son significativamente menores para los grupos tratados (medicamento de referencia y de prueba), que el grupo control (placebo) e iguales entre sí (**cuadro 4.3**). En la **figura 4.3** se muestran las medias y errores estándar del volumen tumoral (mm³). Es

importante hacer notar que al inicio del estudio, los tres grupos tuvieron volúmenes tumorales similares en promedio. Ver **figuras 4.3 y 4.4**.

Cuadro 4.2 *Análisis de máxima verosimilitud del modelo*

Origen	Tipo III		
	Máxima verosimilitud	Grados de libertad	P
(Intersección)	331.128	1	.001
Tratamiento	7.909	2	.019
Tiempo	240.058	7	.001
Tratamiento * Tiempo	3.883	14	.996

Variable dependiente: Volumen

Modelo: (Intersección), Tratamiento, Tiempo, Tratamiento * Tiempo
 Análisis de Máxima Verosimilitud del modelo: el tiempo (P= 0.001) y el tratamiento (P=0.019) mostraron un efecto significativo en el volumen tumoral, mientras que la interacción no fue significativa (P=0.996).

Cuadro 4.3 *Volumen tumoral (mm³) en cada uno de los tratamientos*

Tratamiento	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Med. Prueba	1346.36^a	87.37	1175.11	1517.60
Med. Referencia	1450.50^a	89.11	1275.85	1625.15
Placebo	1696.66^b	90.86	1518.56	1874.76

Se muestran las medias, errores estándar e intervalos de confianza 95% del volumen tumoral en mm³, de los tres tratamientos (independientemente del tiempo).

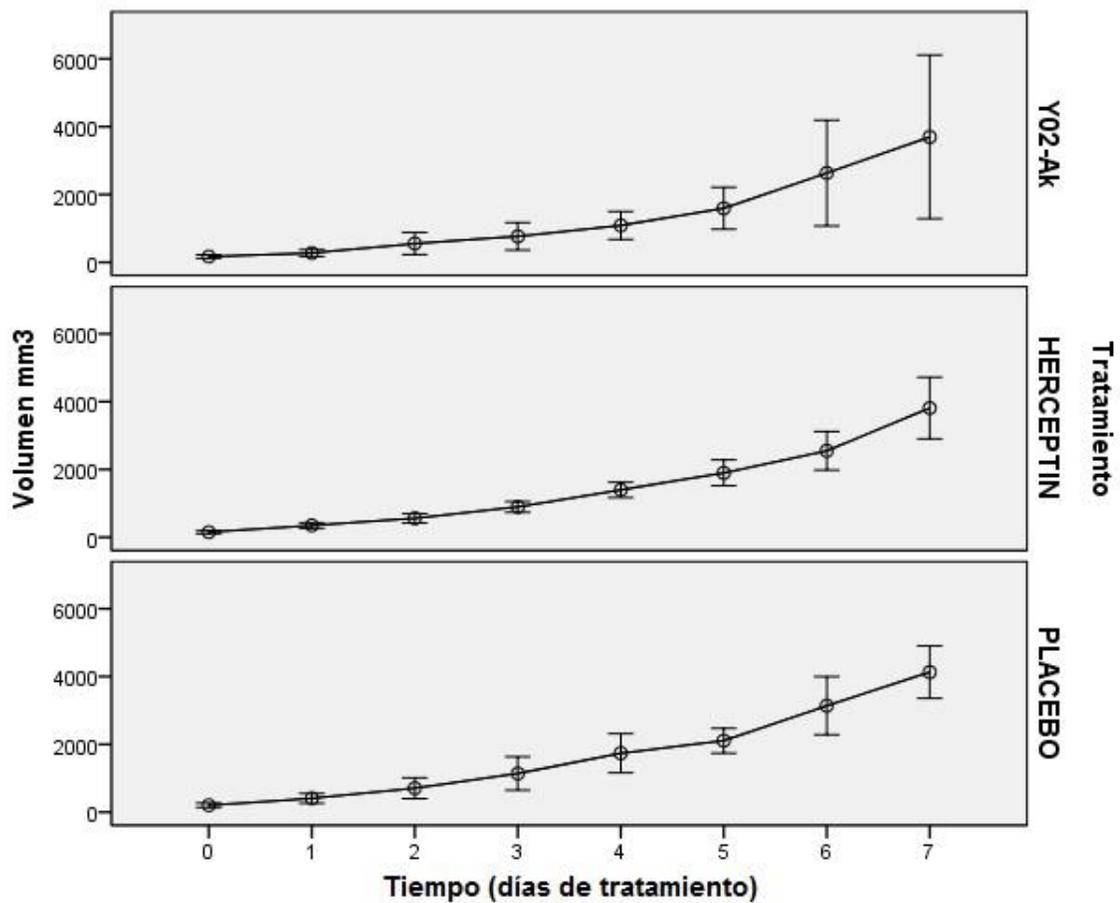


Figura 4.3 Medias y errores estándar del volumen tumoral (mm³)

Medias y desviaciones estándar del volumen tumoral en mm³ por grupo y días de tratamiento (1-7).
 *Herceptin=medicamento de referencia, Y02-Ak=medicamento de prueba.

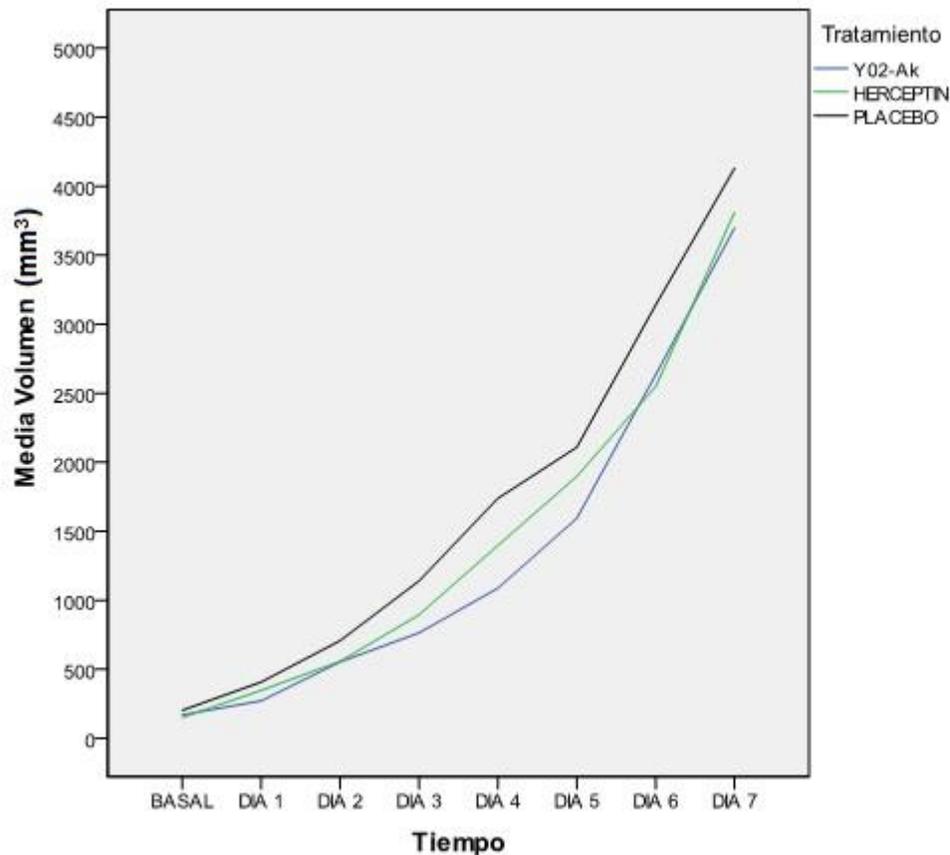


Figura 4.4 Líneas de crecimiento del volumen tumoral en mm³

Líneas de crecimiento tumoral que muestran un comportamiento similar en los tres grupos de tratamiento durante los 7 días.

*Herceptin=medicamento de referencia Y02-Ak=medicamento de prueba.

4.4.2 Necropsias e histopatología

La mayoría de los hallazgos macro y microscópicos se presentaron por igual en los tres grupos de tratamiento. Cabe destacar la presencia de metástasis en cavidad abdominal en todos los animales de los tres grupos. El diagnóstico morfológico encontrado fue carcinoma con metástasis a serosa intestinal y estomacal, cápsula hepática, esplénica, renal y de linfonodos abdominales, parénquima hepático, pancreático, así como permeación vascular en pulmón. A continuación se mencionan las principales alteraciones encontradas en diferentes órganos.

Hígado:

- Degeneración vacuolar leve a moderada, multifocal
- Necrosis leve, multifocal, únicamente en el ratón 17 (tratado con medicamento de referencia).

Riñón:

- Degeneración tubular leve a moderada, difusa y necrosis tubular leve, multifocal

Pulmón:

- Neumonía intersticial neutrofílica e histiocítica leve a moderada, multifocal
- Émbolos neoplásicos en vasos sanguíneos peribronquiales, únicamente en el ratón 15 (tratado con placebo).

Bazo:

- Hiperplasia linfoide leve a moderada, multifocal

Linfonodo:

- Edema leve, difuso
- Linfonecrosis moderada, multifocal, únicamente en el ratón 17 (tratado con medicamento de referencia).

Corazón:

- Degeneración miocárdica leve, multifocal
- Mineralización subepicárdica leve, multifocal, en los ratones 28 y 31 (tratados con placebo y medicamento de referencia, respectivamente).

4.4.2.1 Análisis estadístico del tamaño tumoral “ex vivo”

En la **figura 4.5** se pueden observar las medias y desviaciones estándar. El grupo tratado con el medicamento de prueba tiene el volumen tumoral medio más bajo de todos los grupos. Sin embargo, la variación en todos los tratamientos es grande, por lo cual no se obtuvo una diferencia significativa entre ellos ($P= 0.337$, $1-\beta= 0.43$). En el **cuadro 4.4** se muestran las medias y errores estándar del volumen tumoral *ex vivo* de los tres tratamientos.

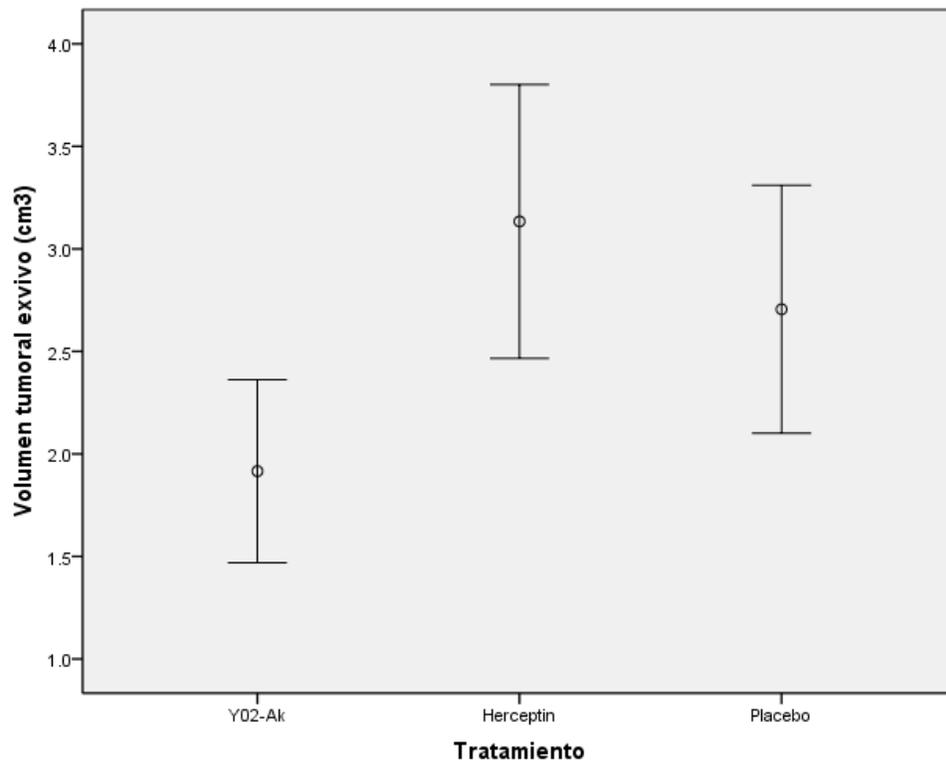


Figura 4.5 *Medias y desviaciones estándar del volumen tumoral (cm³) ex vivo*

A través de las medias y desviaciones estándar del volumen tumoral *ex vivo*, se observa que no hubo diferencias significativas en el tamaño tumoral entre tratamientos ($P=0.337$, $1-\beta=0.43$).

*Se muestran los tres tratamientos del estudio. Herceptin=medicamento de referencia, Y02Ak=medicamento de prueba.

Cuadro 4.4 *Medias del volumen tumoral ex vivo de los tres tratamientos*

Tratamiento	N	Medias ± Error estándar
Prueba	9	1.92±1.42
Placebo	10	2.70±1.90
Referencia	10	3.13±2.11

4.4.3 Inmunohistoquímica

HER-2. En todos los grupos de tratamiento se detectó la expresión de HER-2; sin embargo, el porcentaje de animales que presentaron el marcador fue muy diferente: 20% (2 de 10) en el grupo control, 20% (2 de 10) en el grupo tratado con el medicamento de referencia y 77.8% (7 de 9) en el tratado con el medicamento de prueba. En la **figura 4.6** se muestra un resultado positivo y un negativo a HER-2.

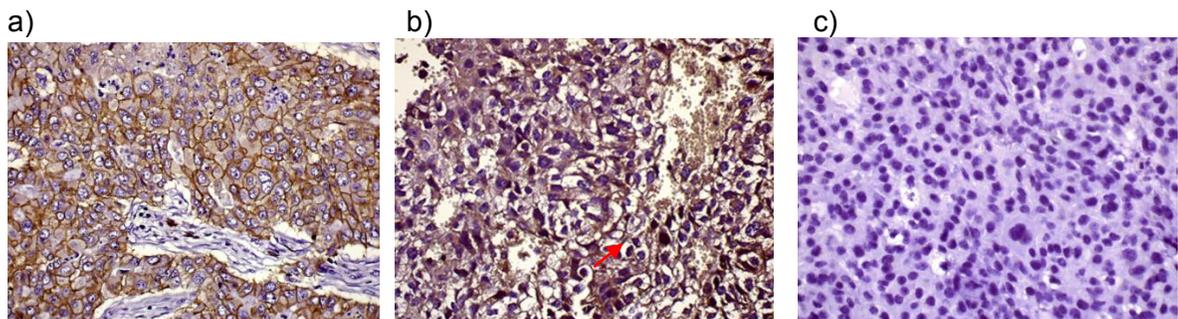
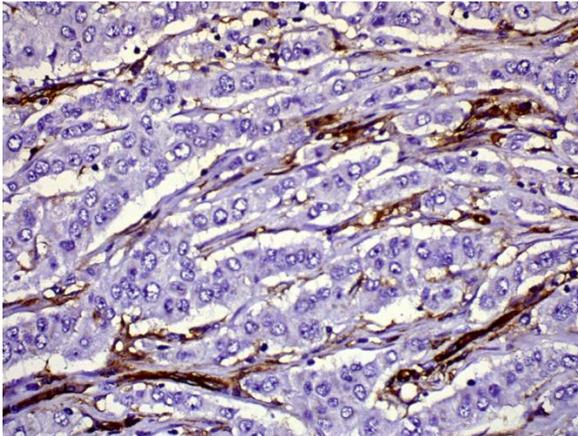


Figura 4.6 *Inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti HER-2*

Campo 400X Resultados de inmunohistoquímica. a) control positivo; b) muestra positiva; c) muestra negativa. Campo 400X.

CD31. La angiogénesis fue similar en los tres grupos de tratamiento ya que el 100% de las muestras fueron positivas a CD31 con 3+. En el grupo tratado con el medicamento de prueba, 8 de 9 tumores presentaron entre 0 y 33 vasos sanguíneos, y uno de 34 a 67. En el grupo tratado con el medicamento de referencia, 7 de 10 tumores presentaron de 0 a 33 vasos sanguíneos, y 3, de 34 a 67. En el caso de los tratados con Placebo, 9 de 10 tumores presentaron de 0 a 33 vasos, y uno, de 34 a 67. Lo anterior indica que las muestras correspondientes a los grupos tratados con el medicamento de prueba y placebo tuvieron un comportamiento muy similar, donde aproximadamente el 90% de los casos mostraron de 0 a 33 vasos positivos por campo de 400X y el 10% de los casos de 34 a 67 vasos positivos. El grupo del medicamento de referencia presentó una angiogénesis ligeramente mayor, ya que el 30% de los casos tuvo entre 34 a 67 vasos positivos. En la **figura 4.7** se muestra un resultado positivo y un negativo a CD31. Los resultados se resumen en la **figura 4.8** y en el **cuadro 4.5**.

a)



b)

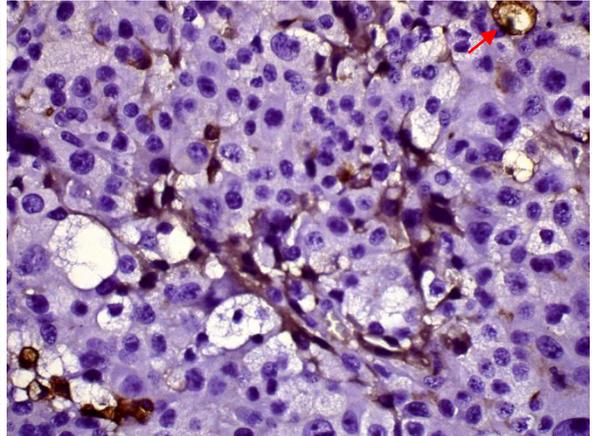


Figura 4.7 *Inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti CD31.*

Resultados de Inmunohistoquímica. a) control positivo; b) muestra positiva. Campo 400X.

Cuadro 4.5 *Resultados de la IHQ con el marcador anti CD31*

Medicamento de prueba		Medicamento de referencia		Placebo	
No. ratón	No. Vasos +	No. ratón	No. Vasos +	No. ratón	No. Vasos +
4	15	3	35	1	16
8	15	5	45	2	2
11	8	9	10	12	26
16	10	10	35	13	56
19	6	17	8	14	17
25	45	18	20	15	14
29	12	21	0	23	8
30	10	22	32	24	0
32	25	26	24	27	8
		31	0	28	0

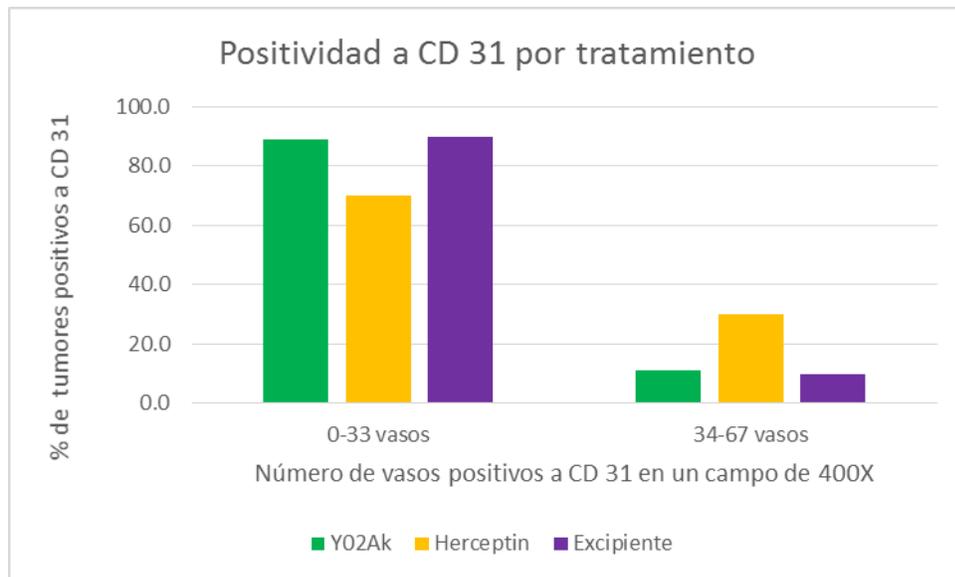


Figura 4.8 *Resultados de inmunohistoquímica de CD31*

Porcentaje de muestras tumorales por grupo que fueron positivas a CD31 en 0 a 33 vasos y de 34 a 67 vasos. Y02Ak= medicamento de prueba. Herceptin= medicamento de referencia.

IgG. Los tumores de los animales pertenecientes al grupo de placebo no tuvieron marca con el anticuerpo anti IgG humana. Los grupos tratados con el medicamento de referencia y de prueba mostraron una marca positiva en el 70% (7 de 10) y 88.9% (8 de 9) de los tumores analizados, respectivamente. En la **figura 4.9** se muestra un resultado positivo y un negativo a IgG. Los resultados se resumen en la **figura 4.12**.

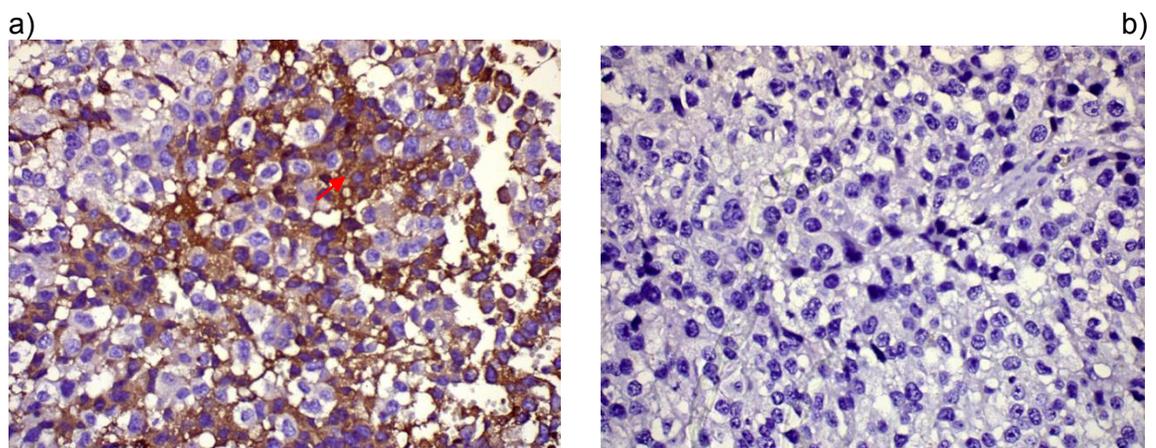
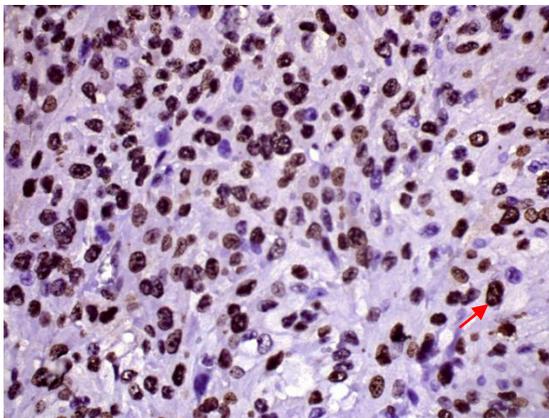


Figura 4.9 *Inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti IgG humana.*

Resultados de inmunohistoquímica, a) muestra positiva; b) muestra negativa. Campo 400X.

Ki67. La expresión de la proteína Ki-67 se observó en todos los tejidos, siendo del 100% (9 de 9) en el medicamento de prueba, del 90% (9 de 10) en el medicamento de referencia y del 80% (8 de 10) en placebo. Posteriormente se determinó el porcentaje de núcleos positivos (campo 400X) en cada caso. Los grupos del medicamento de prueba y referencia se comportaron prácticamente igual, mostrando un 62.2 y 61.1 % de núcleos positivos en las células tumorales, respectivamente. El grupo de placebo, tuvo un promedio de 70% de núcleos positivos. En la **figura 4.10** se muestra un resultado positivo y un negativo a IgG. Los resultados se resumen en la **figura 4.12** y el **cuadro 4.6**.

a)



b)

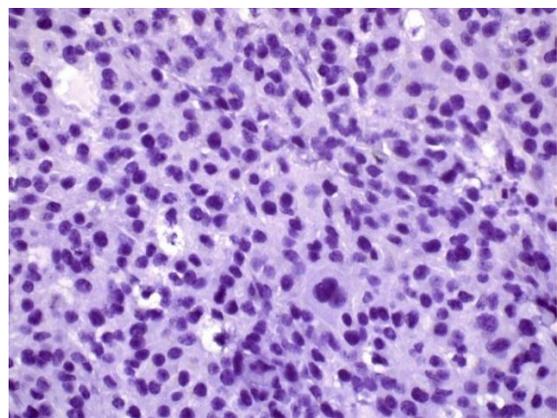


Figura 4.10 *Inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti Ki67.*

Resultados de inmunohistoquímica, a) muestra positiva; b) muestra negativa. Campo 400X.

TUNEL. De acuerdo con los resultados respecto a la apoptosis, los tratamientos de medicamento de prueba y de referencia se comportaron de forma muy semejante, mostrando 55.6% (5 de 9) y 50% (5 de 10) de las muestras tumorales positivas a TUNEL, respectivamente. Es decir, en la mitad de los casos se demostró actividad apoptósica. Mientras que en el grupo que recibió placebo, el 80% (8 de 10) de las muestras tumorales fueron positivas. De estas muestras el porcentaje de muerte celular encontrado fue del 46%, 66% y 56%. En la **figura 4.11** se muestra un resultado positivo y un negativo a TUNEL. Los resultados se resumen en la **figura 4.12** y en el **cuadro 4.6**.

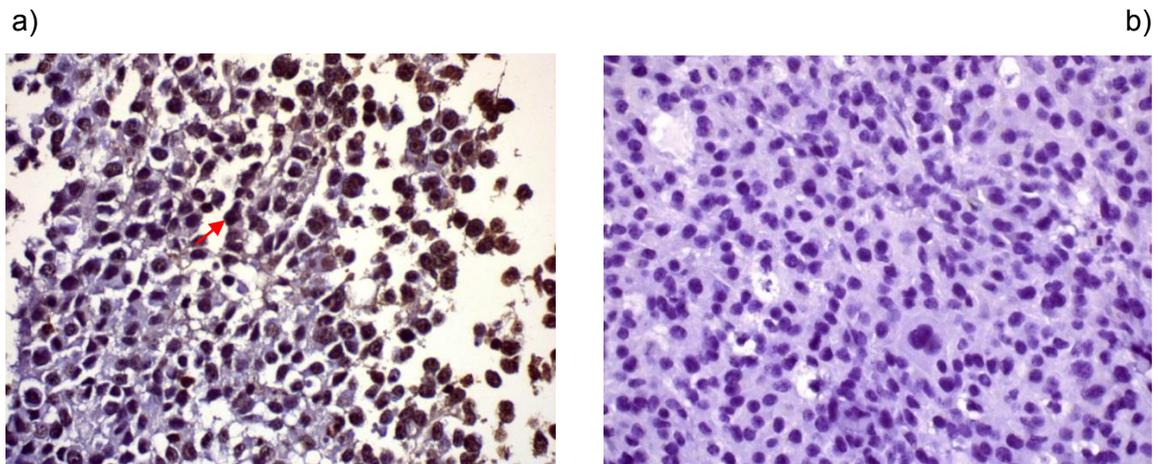


Figura 4.11 *Inmunohistoquímica en la prueba de TUNEL.*

Resultados de inmunohistoquímica, a) muestra positiva; b) muestra negativa. Campo 400X.

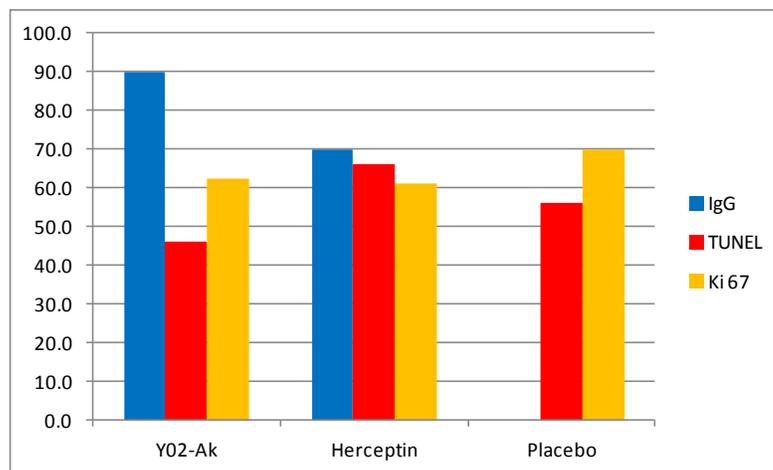


Figura 4.12 *Resultados de inmunohistoquímica: IgG, Ki67 y TUNEL*

Porcentaje de tumores positivos a IgG; y porcentaje de células tumorales en proliferación (Ki67) y en apoptosis por grupo de tratamiento. Y02-Ak= medicamento de prueba, Herceptin=medicamento de referencia.

Cuadro 4.6 Resultados de la IHQ a los diferentes marcadores

Tratamiento	No. ratón	HER-2	TUNEL	Ki67	IgG
Medicamento de prueba	4	3+	3+	3+	3+
	8	3+	3+	3+	3+
	11	-	-	3+	3+
	16	3+	3+	3+	3+
	19	3+	-	3+	-
	25	3+	3+	3+	3+
	29	-	3+	3+	3+
	30	3+	-	3+	3+
	32	3+	-	3+	3+
	Medicamento de referencia	3	-	-	3+
5		-	-	3+	3+
9		-	3+	3+	-
10		-	-	3+	3+
17		-	3+	3+	3+
18		-	3+	3+	-
21		-	-	3+	-
22		3+	3+	3+	3+
26		3+	-	3+	3+
31		-	3+	-	3+
Placebo	1	-	-	3+	-
	2	3+	-	3+	-
	12	3+	2+	3+	-
	13	-	3+	3+	-
	14	-	3+	3+	-
	15	-	3+	-	-
	23	-	3+	3+	-
	24	-	3+	3+	-
	27	-	3+	-	-
	28	-	3+	3+	-

4.5 Discusión

Un hallazgo inesperado en el estudio fue el rápido crecimiento tumoral desarrollado en los tres grupos de tratamiento, lo cual orilló a tomar la decisión de sacrificar prontamente a los animales (al día 7). La razón de lo ocurrido no está clara, pues hay estudios realizados con el mismo modelo animal, misma línea celular y un número de células para implantación incluso mayor que el usado en este estudio, en los cuales los animales se mantienen vivos por más de 50 días (Ren et al., 2014, Xu et al., 2004, Sampath et al., 2007).

En cuanto al tamaño tumoral *in vivo* el grupo placebo mostró un volumen tumoral 20.64 y 14.5% mayor que los tratados con el medicamento de prueba y de referencia, respectivamente. Sin embargo, el análisis del tamaño tumoral *ex vivo* no mostró evidencia de que el volumen tumoral fuera diferente entre los tres grupos de tratamiento, debido a que la dispersión en todos los grupos fue grande. En la medición *in vivo*, al tener varias mediciones en el tiempo se pudo observar una tendencia a la disminución del tamaño tumoral, que no pudo ser demostrada cuando se tomó el tamaño del tumor el día del sacrificio.

En el estudio *post mortem*, tanto en la necropsia como en el análisis histopatológico, no se encontraron diferencias en los grupos tratados con los dos compuestos y el placebo. Las lesiones macro y microscópicas observadas en los diversos órganos y tumores se encontraron en individuos de todos los grupos, por lo que no pueden atribuir diferencias entre los tratamientos.

La expresión de HER-2 en el grupo tratado con el medicamento de prueba fue del 77.8% mientras que en los otros dos grupos (referencia y placebo) fue del 20%. SKBR-3 es una línea celular caracterizada por la sobreexpresión del receptor en su membrana, y por lo tanto, la baja expresión del mismo en el grupo sin tratamiento (placebo) es un hallazgo inesperado. Existen reportes que muestran que la línea celular SKBR-3 presenta a HER-2 en protrusiones de membrana (Hommelgaard et al., 2004), esta localización podría hacer a estos receptores menos accesibles a la unión con el anticuerpo anti HER-2 *in vivo*. Sin embargo, en la prueba de IHQ en la que existe una etapa de permeabilización de membranas este fenómeno no intervendría en la unión del anticuerpo anti HER-2 y

tampoco es suficiente para explicar la diferencia en la expresión de HER-2 entre los tres grupos de estudio. Cabe señalar que la determinación de la presencia de IgG es una forma indirecta de identificar la presencia de HER-2. En este caso el estudio revela que en ambos grupos había HER-2 intracitoplasmático unido al medicamento.

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio es la positividad encontrada al anticuerpo anti IgG. Esta prueba permitió comprobar que ambos tratamientos, el de prueba y el de referencia, se unen al receptor HER-2 de las células tumorales en un modelo *in vivo* con un comportamiento similar: 88.9% en los tratados con el medicamento de prueba y 70% en los tratados con el de referencia. Se esperaba una correlación entre la unión a HER-2 y la reducción de la proliferación celular debido a que se ha descrito que uno de los mecanismos de acción del medicamento de referencia es la internalización de HER-2 y su destrucción, interrumpiendo la señal de proliferación celular (Menard et al., 2004). Para determinar el porcentaje de células que se encontraban en proliferación celular se utilizó el marcador Ki67. Los resultados encontrados sugieren que los grupos que recibieron tratamiento antineoplásico tuvieron una proliferación celular ligeramente menor que los que recibieron excipiente. Probablemente el tiempo de tratamiento no fue suficiente para observar un mayor efecto. Hay que señalar que en todos los casos el número de muestras positivas fue igual o mayor al 80%. Cabe mencionar que los modelos *in vivo* tienen limitantes que afectan el efecto del tratamiento en la proliferación, lo cual será discutido más adelante.

Los resultados de la técnica de TUNEL indican que los tratamientos del medicamento de prueba y de referencia se comportan igual en cuanto al número de tumores con apoptosis, ya que en ambos casos el porcentaje de tumores que presentaron apoptosis fue cercano al 50%, mientras que en los tumores del grupo placebo fue del 80%. Sin embargo, el porcentaje de células en apoptosis fue semejante en los tres grupos. Cabe señalar que son varios mecanismos los que pueden provocar la apoptosis en las células tumorales; entre éstos se encuentra la hipoxia celular, que normalmente ocurre al centro de la masa tumoral. Debido a que el grupo placebo mostró un mayor volumen tumoral, se puede inferir la presencia de un mayor número de células con hipoxia y por lo tanto necrosis o apoptosis. Es importante mencionar que la prueba de TUNEL, si bien es un marcador de apoptosis puede dar un resultado positivo en otros tipos de muerte celular (Kelly et al., 2003). Por otro lado, hay que destacar que la inducción de apoptosis a través de células

NK que reconocen la fracción FC del anticuerpo (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), es el principal mecanismo de inducción de apoptosis del fármaco. Sin embargo, este mecanismo no se podría observar en un modelo murino ya que las células NK de ratones no pueden unirse a anticuerpos humanos.

4.6 Conclusiones

No hubo diferencias entre el medicamento de prueba y el de referencia en su capacidad para reducir el tamaño tumoral *ex vivo*, reducir la angiogénesis, unión a HER-2, inducción de apoptosis ni proliferación celular.

En cuanto al tamaño tumoral *in vivo* se encontraron diferencias entre los animales tratados con el medicamento de prueba o de referencia y el grupo placebo, siendo mayor el tamaño en este último. En el resto de las variables evaluadas no se encontraron diferencias con respecto al grupo tratado con placebo. Los estudios no fueron suficientes para determinar que los medicamentos son biocomparables en eficacia *in vivo*.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios de toxicidad aguda y a dosis repetidas, mostraron que no hubieron diferencias entre el medicamento de referencia y el medicamento de prueba, por lo tanto, en términos de seguridad, son biocomparables. Ambos medicamentos fueron bien tolerados y no se registraron efectos tóxicos en ninguno de los estudios. Estos resultados coinciden con diferentes estudios que demuestran que los anticuerpos monoclonales generalmente son bien tolerados y seguros, coincidiendo especialmente con los resultados del medicamento de referencia (Roche, 2010).

Los estudios de seguridad preclínica son de enorme importancia ya que con base en éstos, se toman decisiones en estudios clínicos realizados en humanos, por ejemplo, el establecimiento de la dosis inicial de tratamiento (Tabrizi and Roskos, 2007). Los anticuerpos monoclonales se caracterizan por su alta especificidad a su antígeno blanco, por lo que es fundamental tener presente que debido a la variabilidad antigénica que hay entre especies, la unión de los anticuerpos monoclonales también varía de especie a especie. Además, es importante destacar que las funciones efectoras de los anticuerpos monoclonales, no sólo le dan actividad farmacológica, sino determinan los posibles efectos tóxicos. He ahí la gran importancia de seleccionar un modelo animal apropiado en el estudio.

El requerimiento principal en la selección de una especie para los estudios de seguridad, es que el anticuerpo monoclonal tenga reacción cruzada con el antígeno del modelo animal (Tabrizi and Roskos, 2007). Es decir, que reaccione tanto con el antígeno humano como con el de la especie propuesta en el estudio. Sin embargo, la investigación se puede enfrentar a un gran problema: la falta de especies con reactividad cruzada. Tal es el caso del anticuerpo monoclonal evaluado en este proyecto, ya que el receptor HER-2 en ratones es antigénicamente diferente al de humanos, impidiendo la unión del medicamento en estudio (Roche, 2010). Cuando este es el caso, lo ideal es generar anticuerpos monoclonales capaces de reconocer al antígeno y en caso extremo que la especie no exprese el antígeno, sería necesario usar animales transgénicos (Tabrizi and Roskos, 2007).

En este proyecto se usaron ratones Hsd: ICR "S.P.F". a pesar de no presentar antigenicidad cruzada, debido a dos razones principales. La primera es que para el estudio de toxicidad a dosis repetidas se empleó la especie *Macaca mulatta*, la cual es una especie relevante con antigenicidad cruzada, y este estudio puede aportar información importante de toxicidad aguda también. La segunda razón, es que la toxicidad de un medicamento no únicamente puede deberse a su principio activo (anticuerpo monoclonal) sino a otros componentes. En este caso, los medicamentos contienen alcohol bencílico como conservante a una concentración de 1.1%, con la cual pueden haber reacciones de hipersensibilidad. Tal es el caso publicado por Wilson *et. al* (1986) en el que un paciente tratado con cytarabine (agente quimioterapéutico) conservado con alcohol bencílico, desarrolló hipersensibilidad al alcohol, manifestada con fiebre y lesiones maculopapulares en pecho y brazos (Wilson et al., 1986).

Lo anterior hizo útil realizar las pruebas de toxicidad aguda. Sin embargo, hay que ser cautelosos al transpolar los resultados de dicho estudio al humano, debido a que el modelo animal utilizado no es una especie relevante.

Las pruebas de toxicidad a dosis repetidas, a diferencia de las de toxicidad aguda, se hicieron en una especie relevante (monos *Macaca mulatta*). Es una especie muy útil en el estudio ya que su receptor HER-2 también es reconocido por el anticuerpo monoclonal de referencia, por lo que en este modelo animal se pueden evaluar efectos secundarios ocasionados por la unión del anticuerpo a tejidos sanos que expresan el receptor, por ejemplo, cardiotoxicidad.

Como se mencionó anteriormente, este estudio no mostró diferencias entre el medicamento de referencia y el de prueba, apuntando a que son biocomparables en términos de seguridad. Sin embargo, hubo hallazgos que vale la pena analizar, como pequeños cambios en el ECG en tres individuos (inversión de la onda T), así como generación de inmunogenicidad en uno de ellos.

Está ampliamente descrito, aunque aún no se esclarece el mecanismo, que el principal efecto secundario del tratamiento con el medicamento de referencia es el efecto

cardiotóxico, por lo cual, el ECG es una parte importante de las pruebas de toxicidad a dosis repetidas (Urbano-Moral, 2011). El estudio de toxicidad a dosis repetidas del medicamento de referencia, realizado por la farmacéutica original, también muestra alteraciones en el ECG en casos aislados, reportando ligera disminución en la frecuencia cardiaca y complejos de ondas anormales, a los cuales no se les dio relevancia por presentarse de manera ocasional. Las pruebas de toxicidad a dosis repetidas de la farmacéutica original se realizaron utilizando una dosis semanal durante 26 semanas, o dos dosis a la semana durante 12 semanas y las alteraciones se encontraron a partir de la semana 5, en cambio, en este proyecto, se utilizaron dos dosis durante 4 semanas (Roche, 2010). Es posible que la aparición de un efecto cardiotóxico requiera de más administraciones, sin embargo, en mujeres se ha reportado que los efectos cardiotóxicos pueden aparecer desde la primera administración, situación que enfatiza la importancia de realizar ECG en el estudio. (INFOMED, Formulario nacional de medicamentos, Trastuzumab).

Otro de los hallazgos del estudio de toxicidad a dosis repetidas en monos, fue la generación de inmunogenicidad en una hembra. Este resultado enriquece el análisis sobre la diversidad de respuesta que puede haber a la terapia con anticuerpos monoclonales. La respuesta de anticuerpos en contra del anticuerpo monoclonal administrado puede alterar su farmacocinética y farmacodinamia, la formación de complejos de anticuerpos anti- anticuerpo monoclonal, puede resultar en una eliminación acelerada del medicamento impidiendo su acción apropiada. Tanto en monos como en seres humanos, está reportado que los anticuerpos monoclonales son inmunogénicos en algunos individuos, aunque esto es inevitable, es importante comprobar que el medicamento es poco inmunogénico (Tabrizi and Roskos, 2007, Hwang and Foote, 2005). Lo anterior se demostró al presentarse un solo caso en el grupo del medicamento de prueba

El estudio de eficacia *in vivo* arrojó resultados poco contundentes ya que no se encontraron diferencias entre el medicamento de prueba y el de referencia, lo cual es importante para definirlos como biocomparables, además, en muchas de las pruebas tampoco hubo diferencias con respecto al grupo control (placebo). La única diferencia encontrada fue que los animales que recibieron placebo presentaron un tamaño tumoral *in*

vivo mayor que los otros dos grupos. Este resultado perdió relevancia al demostrarse, con las mediciones *ex vivo*, que no había diferencias de tamaño tumoral entre los grupos. La ausencia de una diferencia evidente entre los grupos que recibieron medicamento y el grupo placebo, puede explicarse por el corto tratamiento (cuatro aplicaciones en vez de las 8 planteadas inicialmente, además de las limitaciones del modelo animal. Emplear animales inmunodeprimidos, no permite valorar el efecto del sistema inmune sobre la formación y progresión tumoral. (Holliday and Speirs, 2011).

A pesar de ello, los modelos de xenotrasplante para eficacia *in vivo* tienen la ventaja de proveer el ambiente completo del organismo. En el modelo utilizado sí podría haberse detectado una disminución en la proliferación tumoral, ya que ésta depende de la unión del fármaco a su receptor.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los mecanismos de acción del medicamento de referencia consiste en detonar la endocitosis de HER-2 y su posterior degradación en proteosomas. Sin embargo, se ha descrito que este receptor puede ser resistente a la internalización al ocultarse ocasionalmente en vesículas de membrana (Hommelgaard et al., 2004). Más importante aún, hay estudios que demuestran que específicamente en la línea celular SKBR-3, utilizada en el estudio, el medicamento de referencia no ocasiona la internalización del receptor HER-2 (Austin et al., 2004, Longva et al., 2005). Otros estudios demuestran que con el medicamento de referencia, la disminución de la proliferación celular en la línea SKBR-3 no se debe a endocitosis de receptores HER-2, sino que, en esta línea celular, el medicamento de referencia detona el reclutamiento de PTEN en la membrana plasmática, ésta es una fosfatasa que inactiva a la vía de señalización de PI3K/Akt, resultando en disminución de la proliferación celular. (Longva et al., 2005).

En el caso de apoptosis, el modelo animal empleado representaba una limitante. Cabe señalar que en la línea celular SKBR-3 el mecanismo de acción más relevante del anticuerpo monoclonal depende del sistema inmunitario del animal. Dicho mecanismo es la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), donde las células NK se unen a la fracción Fc del anticuerpo monoclonal, desencadenando su desgranulación y posterior efecto citotóxico contra la célula tumoral. Esta respuesta está ausente en el modelo

animal utilizado, pues las células NK de ratón no se unen a anticuerpos humanos (Ningyan, 2011).

Para estudiar el efecto de Trastuzumab es necesario utilizar células con sobreexpresión del receptor HER-2, como la línea SKBR-3 en este proyecto. Cabe mencionar que se podrían utilizar otras líneas celulares que también sobreexpresan HER-2, como células MCF-7 y BT 474, éstas líneas no se han documentado como resistentes a la internalización del receptor HER-2, por lo que, al contar con este mecanismo, probablemente se podría apreciar un efecto más evidente en la disminución del tamaño tumoral en un menor tiempo de tratamiento (Holliday and Speirs, 2011, Lewis Phillips et al., 2008).

El modelo de experimentación utilizado, ratones *nu nu*, tenía desventajas, como la incapacidad de generar una respuesta inmunitaria apropiada, que, aunado al corto tratamiento, pudo reflejarse en la ausencia de diferencias entre los grupos de tratamiento en la apoptosis (Holliday and Speirs, 2011). A pesar de esto, el estudio *in vivo* aportó un resultado sumamente valioso, ya que se demostró, a través de inmunohistoquímica, la unión del anticuerpo monoclonal tanto de referencia, como de prueba, al receptor HER-2. Esto se hizo de manera indirecta con la marcación de anticuerpo IgG (correspondiente al anticuerpo monoclonal en estudio) localizado en membrana plasmática de las células tumorales. Esto demostró que el anticuerpo del medicamento de prueba, al igual que el de referencia, se une eficientemente al receptor. Dado que la unión anticuerpo monoclonal - antígeno blanco es la base del mecanismo de acción, este resultado es de gran relevancia.

La unión específica del anticuerpo monoclonal al receptor HER-2 es el primer paso para el efecto terapéutico. Este estudio evidenció que la marcación de HER-2 con inmunohistoquímica es importante, pero no es suficiente para comprender el efecto de la unión del anticuerpo monoclonal a nivel celular.

Con base en lo anterior, es de poca utilidad marcar a los receptores HER-2 en la línea celular SKBR-3. Para futuros estudios, resultaría enriquecedor analizar la actividad de las vías de señalización activadas por el receptor HER-2, y comparar dicha actividad en

animales con y sin tratamiento. Lo anterior sería posible cuantificando moléculas fosforiladas, ej. pAkt o pMAPK, a través de técnicas como Western Blot e inmunofluorescencia.

Los anticuerpos monoclonales están aportando una gran posibilidad terapéutica para varias enfermedades, para que su aplicación crezca, son fundamentales los estudios preclínicos ya que son la base para su posterior implementación en estudios clínicos. El surgimiento de una nueva posibilidad terapéutica puede brindar beneficios a la salud a millones de personas, lamentablemente los costos del tratamiento suelen limitar el acceso a la terapia. La creación de un biocomparable al anticuerpo monoclonal de referencia, puede tener un impacto trascendental al abrir la posibilidad económica de acceder al tratamiento. Con este proyecto pudimos comprobar que, en términos de seguridad, el medicamento de prueba y el de referencia son biocomparables. Respecto al estudio de eficacia *in vivo*, por un lado, se destaca el haber encontrado que el medicamento de prueba se une, al igual que el de referencia, al antígeno blanco, y por otro lado, se evidencia que se requieren más pruebas para conocer el efecto del anticuerpo monoclonal a nivel tumoral, o bien, un modelo animal con características inmunitarias que permitan evaluar de mejor forma la respuesta al tratamiento.

6. ANEXO: proyecto de estancia en la Universidad de Stuttgart

Efecto de diferentes fosfatasa en la vía de señalización de Akt, en cáncer de mama

Estudio realizado durante la estancia en el Departamento de Biología Celular e Inmunología de la Universidad de Stuttgart, Alemania.

Con la finalidad de enriquecer el proyecto de maestría, se realizó una estancia en el periodo de enero a junio del 2014, en el Departamento de Biología Celular e Inmunología de la Universidad de Stuttgart, Alemania; bajo la supervisión de la PhD Profesor Monilola Olayioye.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo general de esta tesis consiste en determinar si el medicamento de referencia y el de prueba son biocomparables. Sin embargo, ampliar el conocimiento sobre los mecanismos del cáncer y específicamente del receptor HER-2, es fundamental para poder interpretar y discutir objetivamente los resultados. Por esta razón, se consideró una excelente oportunidad realizar una estancia de investigación enfocada al estudio del receptor HER-2.

El laboratorio, a cargo de la PhD Profesor Olayioye, tiene como objetivo mejorar el entendimiento sobre el cáncer, enfocándose especialmente en el cáncer de mama. La vía de señalización de Akt, directamente activada por el receptor HER-2, está comúnmente involucrada en el proceso cancerígeno, haciéndola una molécula de interés en la investigación a nivel mundial.

El proyecto de investigación durante la estancia se basó en el estudio de cuatro fosfatasa y su papel en la vía de señalización Akt. Debido a que éste se realizó en el extranjero y bajo la supervisión de otro asesor, se incluye como un estudio independiente al resto del proyecto de maestría.

6.1 Introducción

En el proceso de carcinogénesis son varias las líneas celulares que se encuentran afectadas y que promueven el desarrollo tumoral. Una de las vías más comúnmente alteradas en cáncer es la de Akt. Ésta es un orquestador crucial para la proliferación,

sobrevivencia y crecimiento celular. Cuando se activa de manera aberrante resulta en la desregulación de estos procesos y en inhibición de apoptosis, favoreciendo la tumorigénesis. La proteína Akt tiene dos sitios de regulación de su actividad: Thr308 y Ser473 (dominio hidrofóbico). Para que Akt sea activada requiere de dos fosforilaciones, la primera, por la cinasa PDK-1 en el sitio Thr308 y la segunda, por mTOR en el sitio Ser473 (Brognard et al., 2007). Cabe destacar que la fosforilación en el sitio Thr308, únicamente le aporta el 10% de actividad a Akt, para que la proteína tenga el 100% de su actividad catalítica, debe ocurrir la segunda fosforilación en el sitio Ser473, razón por la cual, éste sitio se considera el más importante en el control de Akt (Brognard and Newton, 2008).

Saber cómo se activa la vía PI3K/Akt es fundamental pero no es suficiente, ya que para un buen funcionamiento celular es tan importante la activación como la inhibición. La vía de señalización de Akt normalmente es inhibida por cuatro fosfatasa: PHLPP1, PHLPP2, PTEN e INPP4b. Las primeras dos, desfosforilan directamente a Akt en el dominio hidrofóbico (Ser473), en cambio, las dos últimas, lo hacen indirectamente a través de desfosforilar a segundos mensajeros (PIP2, PIP3) (Brognard et al., 2007).

Las cuatro fosfatasas mencionadas, pueden estar reducidas o completamente perdidas en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. En caso que la desfosforilación, (inhibición de la vía Akt) no funcione apropiadamente, se promueve la tumorigénesis. Dicho de otra manera, ante la disminución o ausencia de estas fosfatasas, aumenta la fosforilación y actividad de Akt, favoreciendo el cáncer (Brognard and Newton, 2008, Fedele et al., 2010, Hynes and MacDonald, 2009). Prevenir la activación de Akt tiene potencial para la terapia contra cáncer. La meta principal de este proyecto fue entender el papel que juegan las fosfatasas PTEN, INPP4b, PHLPP1 y PHLPP2 en la vía de señalización de Akt.

PTEN es un gen supresor de tumor, localizado en una región que muta con frecuencia en diferentes tipos de cáncer, su producto es la fosfatasa PTEN, un regulador negativo de la actividad de PI3K. Es una de las fosfatasas más ampliamente estudiadas y descritas. Su pérdida o disminución da lugar a la activación descontrolada de Akt, resultando en sobrevivencia celular, crecimiento y proliferación. En cáncer, la reducción de PTEN se puede deber a mutación, inestabilidad protéica o a cambios epigenéticos. En el caso

específico del cáncer de mama, se estima que en el 28% de los casos, esta fosfatasa se encuentra reducida, por lo que resulta de gran interés conocer las implicaciones de esta enzima en la carcinogénesis (Bertucci and Mitchell, 2013, Heering et al., 2009).

INPP4b es otra fosfatasa que recientemente fue descrita como otro gen supresor de tumor en cáncer de mama. INPP4b participa en la regulación de la vía PI3K/Akt en líneas celulares de este tipo de cáncer, desfosforilando segundos mensajeros (PI 3,4P)(Agoulnik et al., 2011). Se ha demostrado que cuando se disminuye la expresión de esta fosfatasa en células de cáncer mamario MCF-7, aumenta la actividad de Akt, resultando en aumento del tamaño tumoral en ratones desnudos. La pérdida de INPP4b se ha asociado con formas agresivas de cáncer de mama y con disminución de la supervivencia (Bertucci and Mitchell, 2013).

Las fosfatasas descritas anteriormente inactivan la vía de Akt de manera indirecta, desfosforilando a segundos mensajeros de la vía PI3K/Akt. Las fosfatasas que desfosforilan directamente a Akt son las llamadas PHLPP, 'flip', (del inglés *pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase*). Existen dos principales: PHLPP1 y PHLPP2, ambas tienen como sustrato principal a Akt pero actúan sobre isoformas diferentes. PHLPP1 desfosforila la isoforma Akt2, mientras que PHLPP2 actúa sobre la isoforma Akt3. La enorme importancia de estas fosfatasas radica en que desfosforilan específicamente al sitio que le da la mayor actividad a Akt, dominio hidrofóbico (Ser473); resultando en disminución de la actividad de la vía, incremento de la apoptosis e inhibición de la proliferación celular (Brognard and Newton, 2008, Brognard et al., 2007). Hay estudios que muestran que células metastásicas de cáncer de mama tienen valores disminuidos de estas fosfatasas e incremento de Akt fosforilado en el sitio Ser473 (Qiao et al., 2007). Dada la importancia de la vía de señalización de Akt en el proceso carcinogénico, las fosfatasas PHLPP juegan un papel fundamental en el progreso de la enfermedad, desfosforilando y por lo tanto, inactivando la vía.

6.2 Objetivos

Objetivo general:

Conocer el papel de las fosfatasas PHLPP1 y PHLPP2, en la vía de señalización de Akt en células MCF-7 y comparar su efecto con el de INPP4b y PTEN.

Objetivos específicos:

- a) Estudiar el efecto de la disminución en la expresión de estas cuatro fosfatasas en la actividad de la vía de señalización de Akt, en células MCF-7.
- b) Analizar las diferencias en la fosforilación en pAkt T308 y pAkt S473, cuando se disminuye la expresión de estas fosfatasas.
- c) Identificar cuál de las fosfatasas tiene el efecto más importante sobre esta vía.
- d) Observar a través de inmunofluorescencia el incremento de la actividad de la vía de Akt, al disminuir la expresión de las fosfatasas.

6.3 Hipótesis

La disminución en la expresión de las fosfatasas (PHLPP1, PHLPP2, PTEN y INPP4B) resultará en un aumento de la fosforilación en la vía de Akt.

6.4 Material y métodos

Cultivo celular de la línea MCF-7

Esta línea celular de cáncer de mama fue el modelo de experimentación utilizado a lo largo del proyecto. Se cultivaba en frascos de 250 mL, realizando pases cada tres días. Se alimentaban con 35mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) al 10% de suero fetal bovino.

Evaluación de expresión de fosfatasa en diferentes líneas celulares

Con la finalidad de decidir qué molécula era de mayor relevancia en el modelo de estudio, se comparó la expresión de la fosfatasa PHLPP1 y PHLPP2 en las líneas celulares de cáncer Hela y MCF-7. Esto se hizo a través de Western blot que se describe posteriormente.

Transfección de ARN de interferencia

La mayoría de los experimentos se basaron en bloquear la expresión de genes (en este caso, fosfatasa) y evaluar el efecto de dicho bloqueo en la vía de señalización de Akt a través de Western Blot. Para lo anterior, se utilizaron ARN de interferencia.

La transfección se realizó en células MCF-7, basado en (Heering et al., 2009). Se usaron placas de seis pozos con 250 mil células cada uno. Los ARN de interferencia transfectados fueron: siPHLPP1, siPHLPP2, siINPP4b, siPTEN y combinaciones entre ellos. Como control de la transfección se usó un Smart pull non target control (siNT ctrl) a una concentración de 20 nM.

Se realizaron dos diseños experimentales. El primero de ellos, consistió en: células control, células con disminución en la expresión de PHLPP2, células con disminución en la expresión de PTEN y células con disminución en la expresión de PHLPP2/PTEN. Este experimento se realizó en tres ocasiones y se denota como “Experimento A”. El segundo experimento consistió en: células control, células con disminución en la expresión de INPP4b, células con disminución en la expresión de PTEN y células con disminución en la expresión de INPP4b/PTEN. Este segundo experimento se realizó en dos ocasiones, y se denota como “Experimento B”.

Western Blot

Esta técnica fue utilizada para detectar proteínas específicas de interés (receptores, fosfatasa y moléculas de señalización), se basó en el procedimiento descrito en (Bischoff et al., 2014). Las células fueron incubadas en medio sin suero 24 horas antes de la estimulación con heregulina con la finalidad de observar un efecto más claro en la activación de la vía Akt. La estimulación con heregulina (1:10,000) se hizo a diferentes tiempos (5, 10, 20 y 60 minutos). Posteriormente se realizó la obtención de proteínas, seguida de la electroforesis en gel y transferencia de proteínas a membrana absorbente

de nitrocelulosa (paso denominada “Blotting”). Se utilizó la tubulina como control de carga. A través de anticuerpos primarios y secundarios se detectaron las proteínas de interés. Ver **cuadros 6.1 y 6.2**.

Cuadro 6.1 *Anticuerpos primarios*

Primarios			
Anticuerpos	Tipo/ especie	Peso de la molécula	Marca
Anti-PHLPP1	Policlonal/ conejo	185 kDa	Abcam
Anti-PHLPP2	Policlonal/ conejo	190 kDa	Abcam
Anti-PTEN	Monoclonal/conejo	54 kDa	Cell Signaling
Anti-INPP4b	Monoclonal/conejo	110 kDa	Cell Signaling
Anti-Akt total	Monoclonal/ ratón	60 kDa	Cell Signaling
Anti- Phospho Akt (Thr308)	Monoclonal/conejo	60 kDa	Cell Signaling
Anti- Phospho Akt (Ser473)	Monoclonal/ conejo	60 kDa	Cell Signaling
Anti-Her2	Monoclonal/ratón	185 kDa	Thermo
Anti-Phospho Her2	Monoclonal/ conejo	185 kDa	Cell Signaling
Anti-Her3	Monoclonal/ratón	185 kDa	Thermo
Anti-Phospho Her3	Monoclonal/ conejo	185 kDa	Cell Signaling
Anti-Tubulina	Monoclonal/ ratón	50 kDa	Sigma

Cuadro 6.2 *Anticuerpos secundarios*.

Secundarios			
Anticuerpo	Tipo/especie	Ig que detecta	Marca
Anti-Conejo	Policlonal/cabra	IgG, IgA	Li-COR
Anti-ratón	Policlonal/cabra	IgG 1,2,3	Li-COR
Anti-Conejo	Policlonal/burro	IgG	HE Healthcare Life Sciences
Anti-ratón	Policlonal/cabra	IgG	HE Healthcare Life Sciences

La unión antígeno anticuerpo fue evaluada con dos métodos diferentes:

- a) Por actividad enzimática. En ésta se utilizan películas de revelado.
- b) Por fluorescenci
- c) a: en este caso se ocuparon anticuerpos secundarios marcados y los resultados se obtuvieron a través de cámara infrarroja (ODISSEY).

La obtención de imágenes arroja resultados cualitativos, para obtener resultados más confiables, se realizó la cuantificación utilizando el software Image J. En cada repetición de los experimentos se cuantificó: pAkt Thr308, pAkt Ser473, Akt y tubulina. Los valores de pAkt Thr308 y pAkt Ser473 se normalizaron sobre tubulina.

Inmunofluorescencia

Para ampliar las técnicas con las que se evaluó el efecto de bloqueo de la expresión de fosfatasa en células de cáncer de mama, se realizó inmunofluorescencia de acuerdo con (Bischoff et al., 2014). Se cultivaron células en placas y posteriormente fueron fijadas con colágeno en laminillas. A través de reacciones fluorescentes antígeno-anticuerpos se observó la expresión de diferentes moléculas en células completas. La observación se hizo con el microscopio para inmunofluorescencia LSM.

6.5 Resultados

La línea celular MCF-7, expresa más PHLPP2 que PHLPP1 (**figura 6.1**).

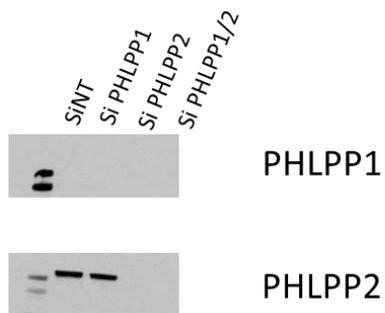


Figura 6.1 *Expresión de PHLPP1 y PHLPP2 en células MCF-7.*

La evaluación de la expresión de ambas fosfatasa en 7 líneas celulares diferentes (**figura 6.2**) corroboró que las células MCF-7 expresan PHLPP2 en mayor cantidad que PHLPP1.

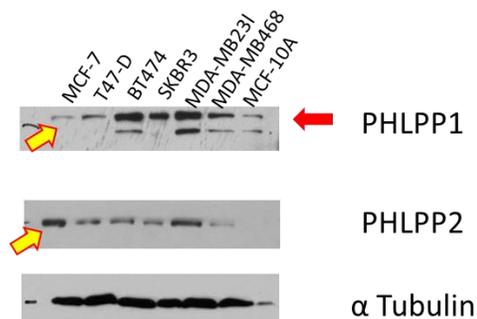


Figura 6.2 *Expresión de PHLPP1 y PHLPP2 en diferentes líneas celulares.*

Experimento A.

En el experimento A, en el que se disminuyó la expresión de PHLPP2 y PTEN se puede observar un aumento en la fosforilación de Akt tanto en el sitio S473 como en el T308 (**figura 6.3**). Dicho aumento es evidente en las células con disminución en la expresión de PTEN, y aún mayor cuando esta fosfatasa es disminuida en combinación con PHLPP2. La disminución de PHLPP2 por sí sola no tiene un efecto evidente en la fosforilación de Akt. Un hallazgo interesante en este experimento, fue un evidente aumento en el HER-2 fosforilado cuando PHLPP2 y PTEN están disminuidas.

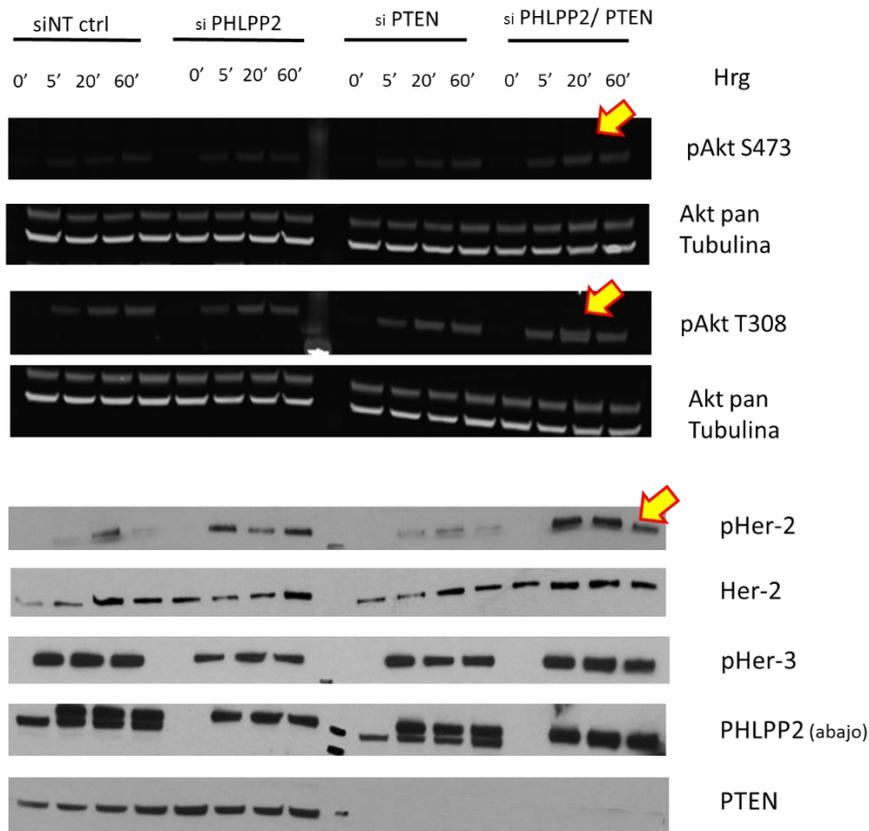


Figura 6.3 *WB del experimento A*

Se usaron células con disminución de la expresión de PHLPP2, PTEN y PHLPP2/PTEN.

Figura 6.4 Experimento A.1. Cuantificación de pAkt T308/Tubulina

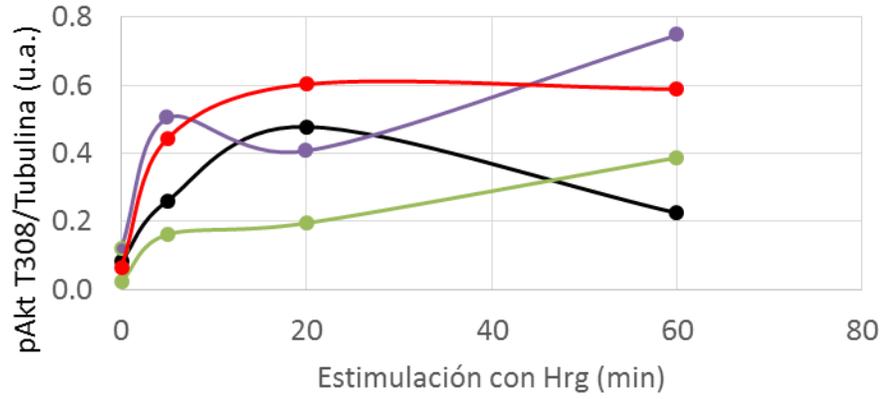
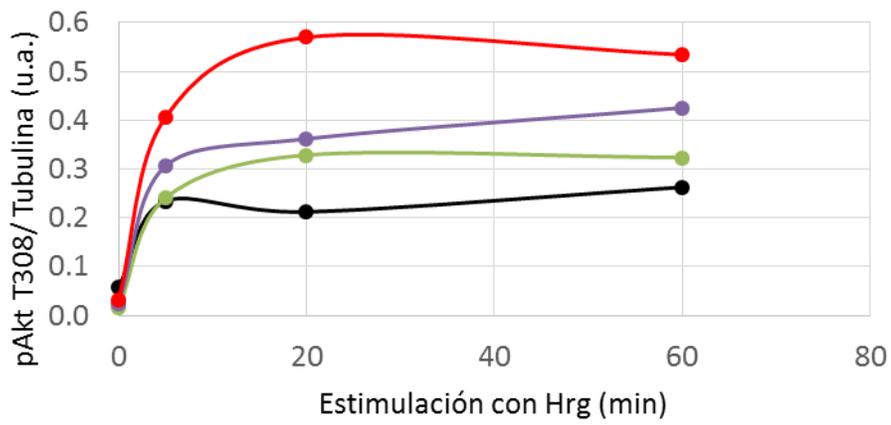


Figura 6.5 Experimento A.2. Cuantificación de pAkt T308/Tubulina



- Control
- siPHLPP2
- siPTEN
- si PHLPP2/PTEN

Figura 6.6 Experimento A.3. Cuantificación de pAkt T308/Tubulina

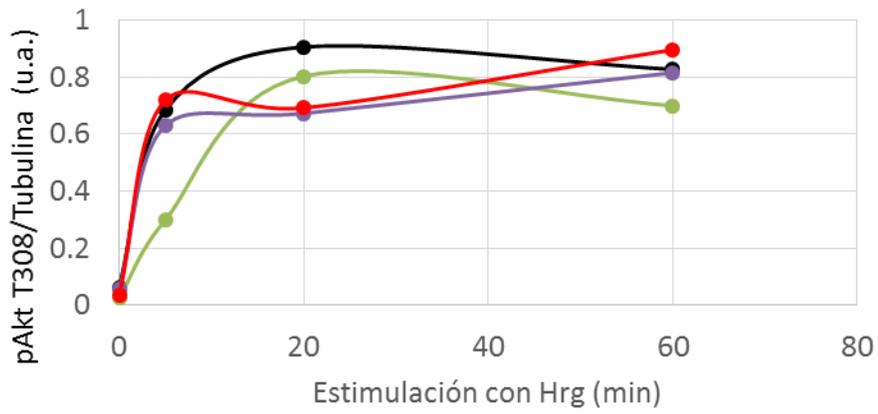
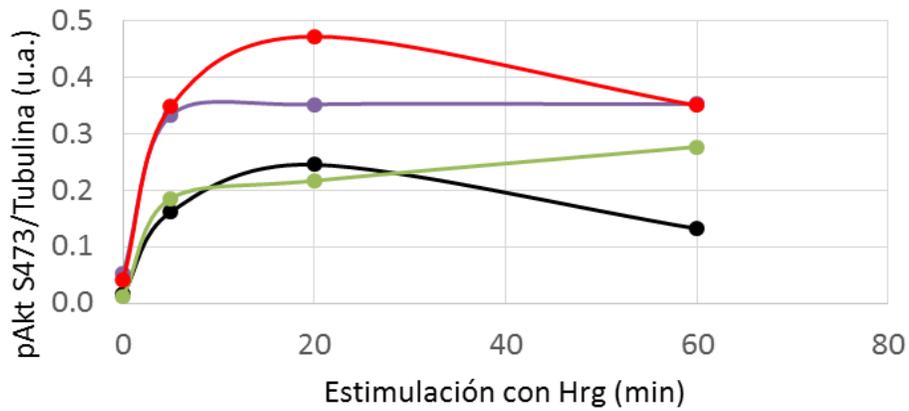


Figura 6.7 Experimento A.1. Cuantificación de pAkt S473/Tubulina



- Control
- siPHLPP2
- siPTEN
- si PHLPP2/PTEN

Figura 6.8 Experimento A.2. Cuantificación de pAkt S473/Tubulina

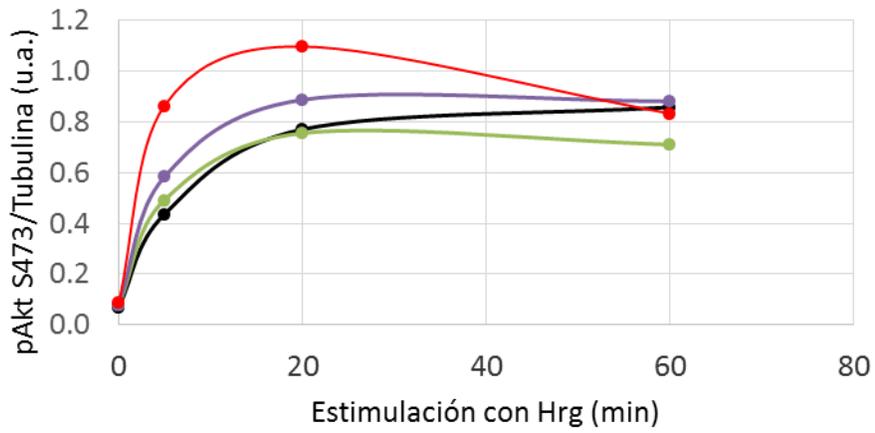
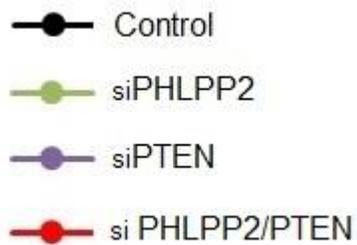
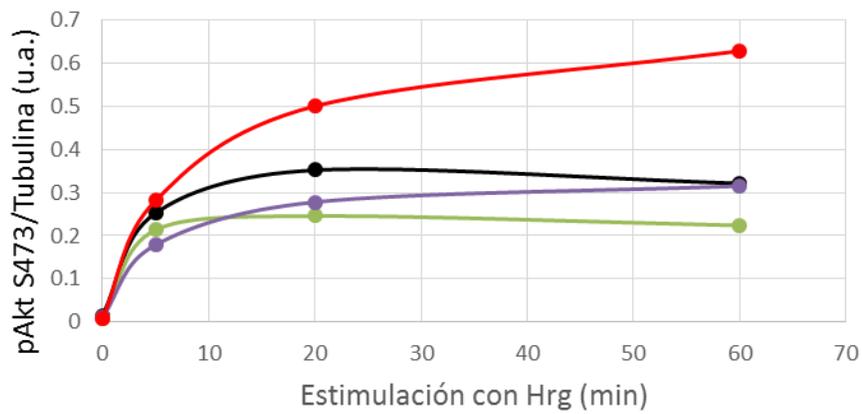


Figura 6.9 Experimento A.3. Cuantificación de pAkt S473/Tubulina



Experimento B.

En el experimento B, de manera similar al experimento A, a través del Western blot se observa un incremento en la fosforilación de Akt en los sitios T308 y S473 (**figura 6.10**). Dicho aumento es más evidente cuando ambas fosfatasa, INPP4b y PTEN, están disminuidas. Nuevamente, la disminución de PTEN es suficiente para observar un incremento en la fosforilación de Akt.

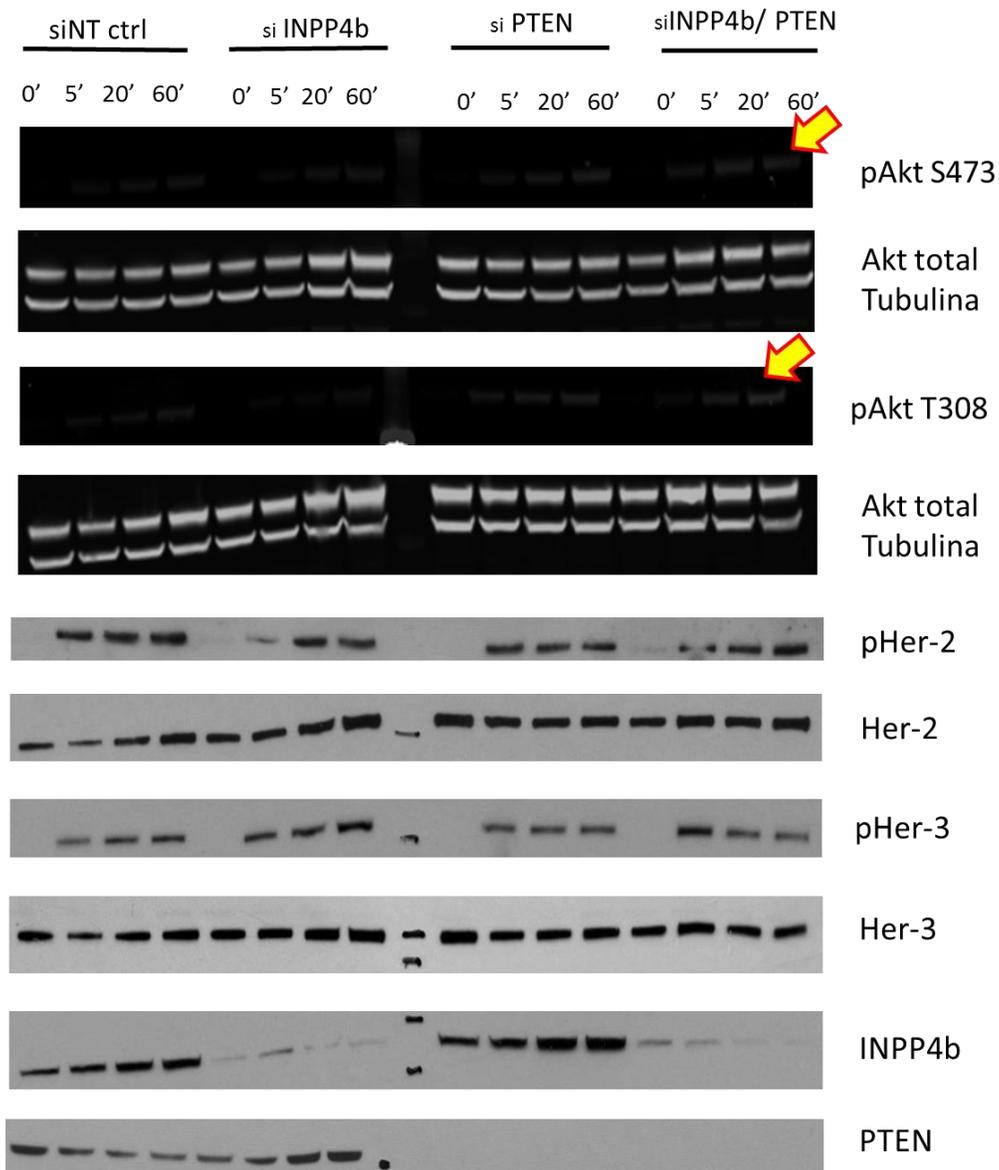


Figura 6.10 WB del experimento B

Se usaron células con disminución de la expresión de INPP4b, PTEN y INPP4b/PTEN.

Figura 6.11 Experimento B.1. Cuantificación de pAkt T308/Tubulina

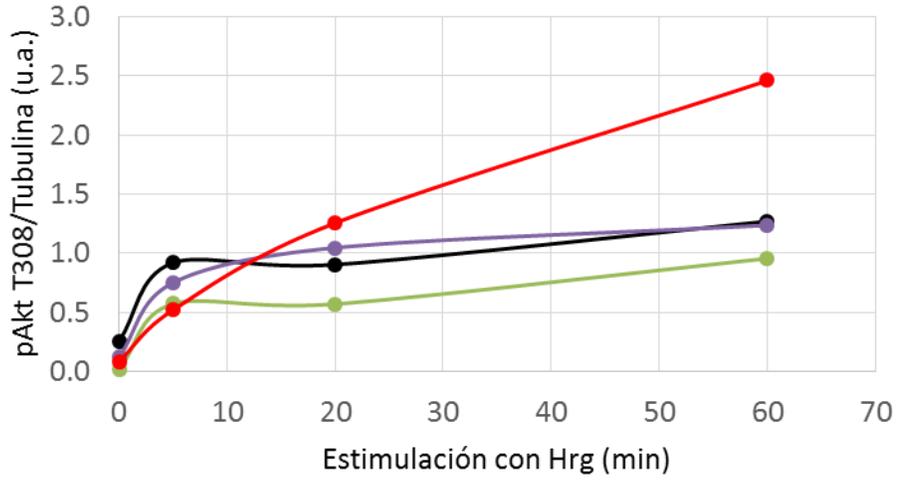
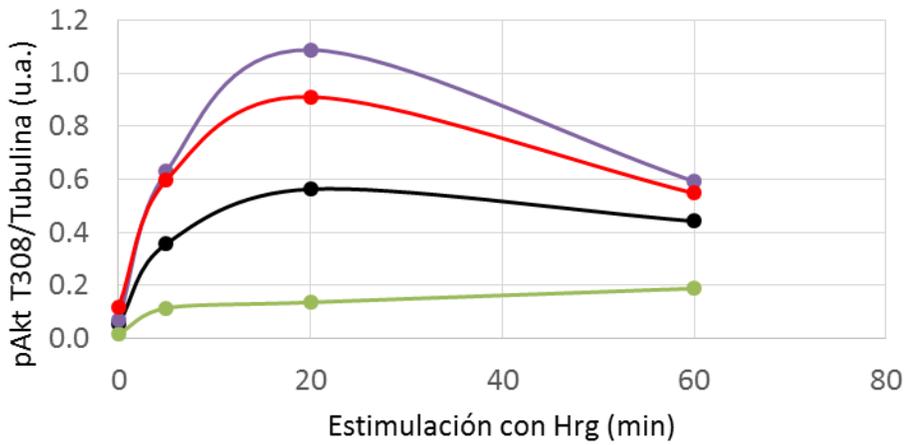


Figura 6.12 Experimento B.2 Cuantificación de pAkt T308/Tubulina



- Control
- siINPP4B
- siPTEN
- si INPP4B/PTEN

Figura 6.13 Experimento B.1. Cuantificación de pAkt S473/Tubulina

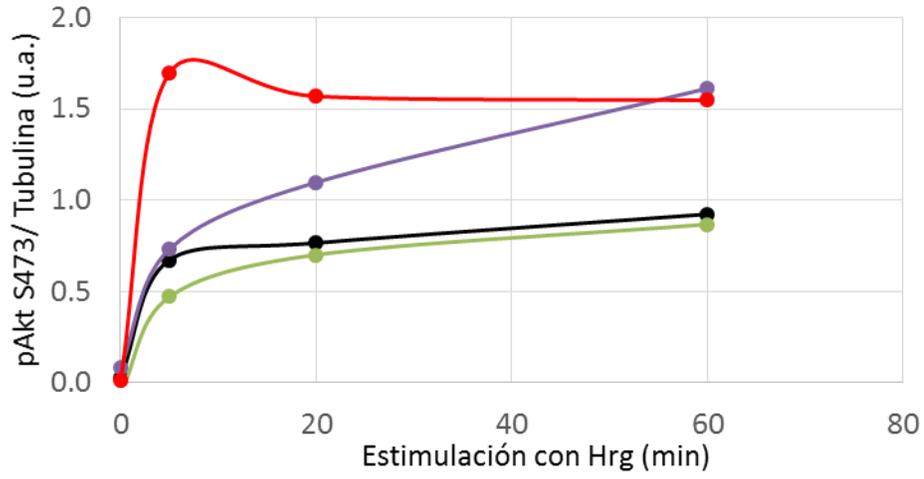
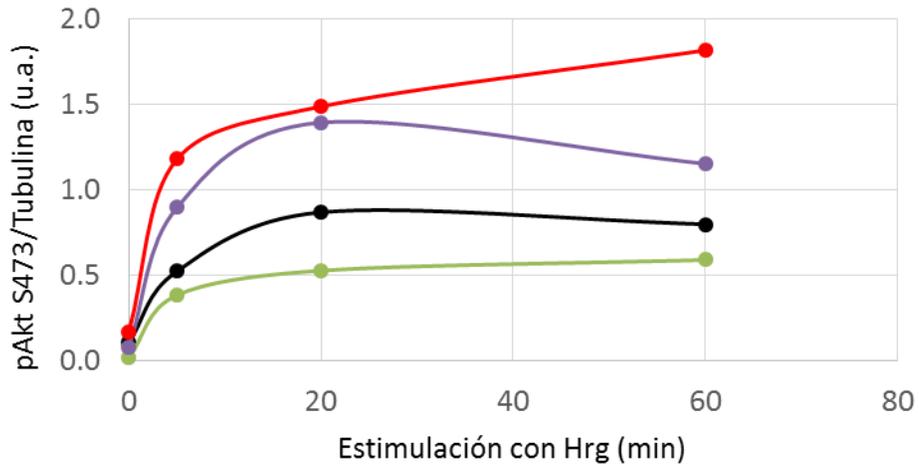


Figura 6.14 Experimento B.2. Cuantificación de pAkt S473/Tubulina



- Control
- siINPP4B
- siPTEN
- si INPP4B/PTEN

Figura 6.15 Medias del experimento A, para pAkt S473/Tubulina.

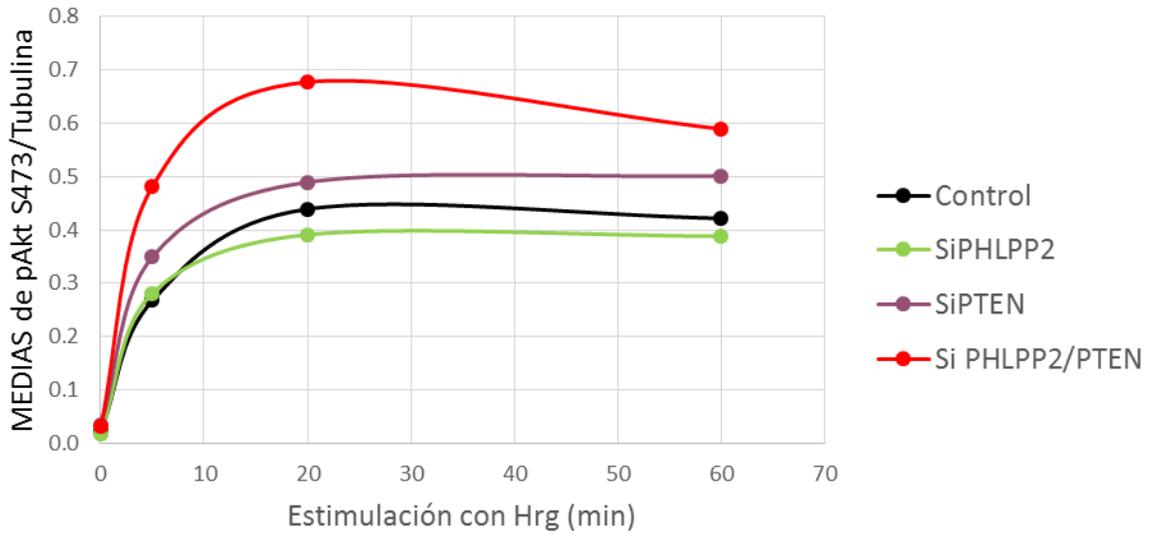
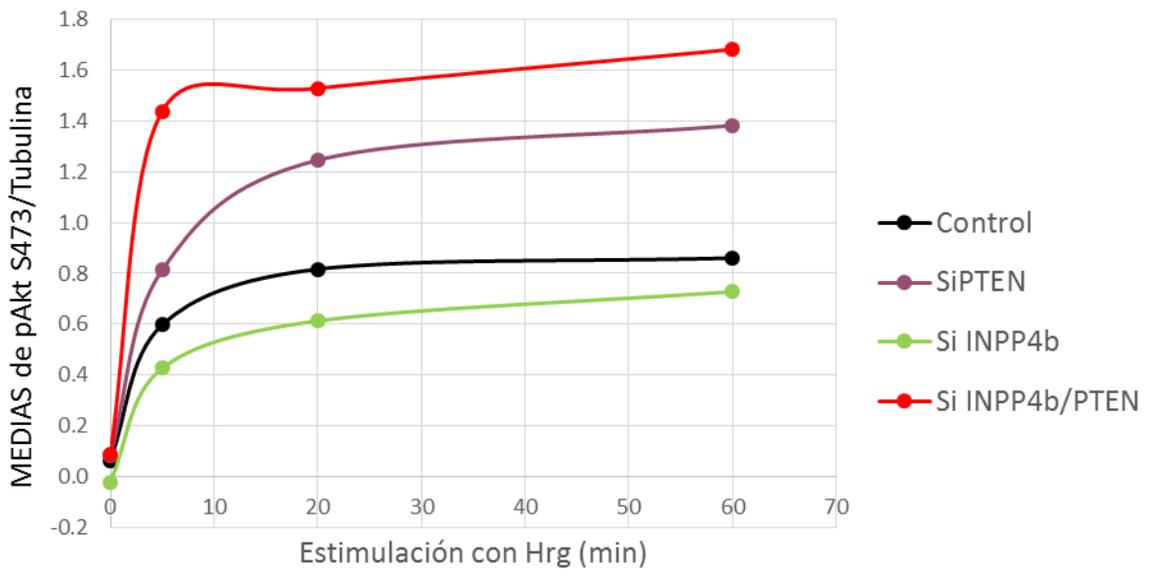


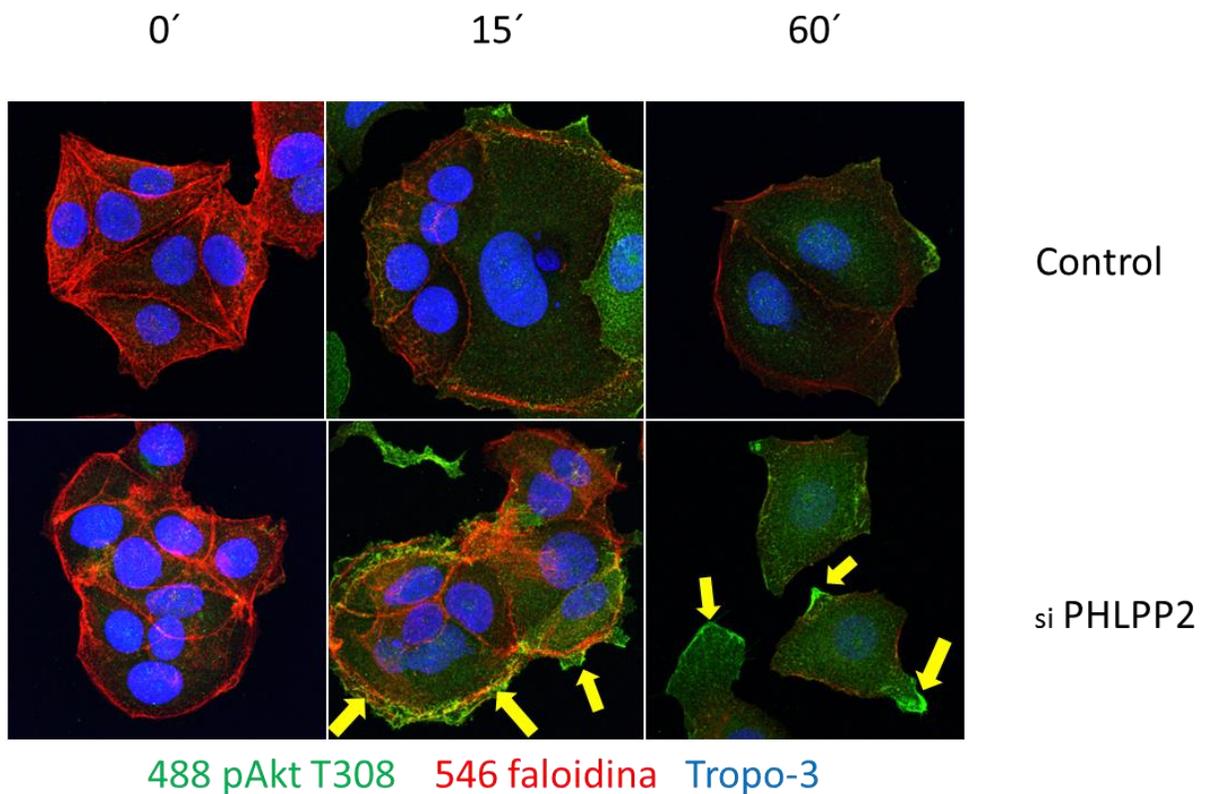
Figura 6.16 Medias del experimento B, para pAkt S473/Tubulina.



Inmunofluorescencia

Se observó un aumento en la actividad de Akt Thr308 en las células con disminución en la expresión de PHLPP2 estimuladas durante 15 y 60 minutos con heregulina, en comparación con las del grupo control. Dicho aumento actividad, se hace visible por un incremento en la intensidad del color verde en la membrana celular.

Figura 6.17 *Inmunofluorescencia de células MCF-7*



Inmunofluorescencia de células MCF-7 con disminución en la expresión de PHLPP2. Activación de Akt observada por microscopio de inmunofluorescencia. Células MCF-7 fueron estimuladas a diferentes tiempos (0, 15, 60 minutos) con heregulina (10 ng/ μ L). Las imágenes fueron obtenidas utilizando ajustes idénticos, corresponden a proyecciones de varias secciones confocales.

6.6 Discusión

Debido a que la línea celular MCF-7, expresa más PHLPP2 que PHLPP1 (**figura 6.1**), los experimentos consecutivos se diseñaron con esta primera fosfatasa. Para asegurar que los anticuerpos funcionaban y que la detección era adecuada, se evaluó la expresión de ambas fosfatasas en 7 líneas celulares diferentes (**figura 6.2**). Con esto se corroboró que

la técnica de detección funcionaba apropiadamente y que, en efecto, las células MCF-7 expresan más PHLPP2 que PHLPP1.

Tanto en el experimento A como en el B se cuantificó la fosforilación de Akt en el sitio S473 y T308. Los resultados fueron más consistentes para el caso de pAkt S473 y, aunado a que éste es el sitio que le da actividad biológica a Akt, únicamente se discutirán los resultados en este sitio de fosforilación.

En el experimento A, el máximo aumento en la fosforilación de Akt en S473 se observa cuando ambas, PHLPP2 y PTEN, están disminuidas (**figuras 6.7-6.9**). En dos ocasiones este aumento es más del doble que en el caso control. Por sí sola, la disminución de PTEN provoca un aumento en la fosforilación de Akt, lo cual no ocurre cuando PHLPP2 es disminuida. Lo anterior muestra un efecto sinérgico ante la disminución de ambas fosfatasa, lo cual sugiere que cuando sólo una de ellas está disminuida, la otra puede compensar la actividad en desfosforilar a Akt.

Esta idea se refuerza con los resultados del Western blot de la figura 1, en la determinación de PTEN, donde se observa que su expresión aumenta en células transfectadas con siPHLPP2.

En el experimento B, la cuantificación de pAkt S473 (**figuras 6.13 y 6.14**) refleja con claridad lo observado en el Western blot: el aumento en la fosforilación de Akt es más evidente al disminuir la expresión de ambas fosfatasa. En el experimento B.1 y B.2 (**figuras 6.13 y 6.14**) es interesante observar que cuando se disminuye únicamente INPP4b, el nivel de fosforilación de Akt se encuentra por debajo, incluso, que en las células control. Además, a través del western blot, se puede observar que la expresión de INPP4b aumenta cuando se disminuye la expresión de PTEN y viceversa (**figura 6.10**). Ambos hallazgos sugieren nuevamente, que hay retroalimentación entre las fosfatasa, de manera que cuando se disminuye la expresión de sólo una de ellas, la otra puede compensar la actividad sobre Akt.

Con la finalidad de integrar todas las repeticiones del experimento A y del B, se realizó una gráfica con las medias del nivel de pAkt S473, para cada uno de los experimentos (**figuras 6.15 y 6.16**). Aquí se observa claramente que el efecto de silenciar fosfatasa fue similar en ambos experimentos, A y B. En ambos diseños experimentales encontramos que: el máximo aumento en la fosforilación de pAkt S473 se obtiene disminuyendo PTEN

en combinación con otra fosfatasa (PHLPP2 en el experimento A, o INPP4b en el experimento B), que la disminución de PTEN provoca un aumento en la fosforilación de Akt, que la disminución de PHLPP2 o INPP4b por sí solas no aumentan el nivel de fosforilación de Akt, por el contrario, la fosforilación es menor que en las células control.

En ambos experimentos, al comparar el efecto de disminuir la expresión de las fosfatasas por separado, la disminución en la expresión de PTEN tiene un efecto mucho más evidente en el aumento de la fosforilación de Akt. Dicho efecto no se observa cuando se analiza el efecto de disminuir la expresión de PHLPP2 o INPP4b. Sin embargo, cuando PTEN se disminuye en combinación de cualquiera de las otras fosfatasas, el aumento de la fosforilación de Akt es mayor que la sumatoria de los efectos de la disminución de cada fosfatasa por separado. Esto sugiere dos cosas. Por un lado, tal y como lo describe la literatura, la fosfatasa PTEN tiene un papel importantísimo en la desfosforilación (inhibición) de la vía de señalización de Akt (Brognard and Newton, 2008, Bertucci and Mitchell, 2013, Longva et al., 2005). Y por otro lado, que cuando la expresión de PTEN se disminuye junto con la expresión de PHLPP2 o INPP4b, el efecto en la fosforilación de la vía de Akt es sinérgico.

En estudio de inmunofluorescencia, se disminuyó la expresión de PHLPP2 debido a que es la fosfatasa de mayor interés en el estudio. Se midió la fosforilación en el sitio T308, a pesar de no ser el más importante por razones de disponibilidad de material en el laboratorio y por contar con la estandarización de la técnica para detectar dicho sitio de fosforilación. Cabe aclarar que este experimento se realizó únicamente una ocasión, lo cual limita la interpretación. En las células con disminución en la expresión de PHLPP2, a los 15 y 60 minutos de estimulación con heregulina, se observa un aumento en la intensidad del color verde de la membrana celular, sugiriendo un incremento en la fosforilación de Akt en el sitio T308 (**figura 6.17**), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el Western blot.

Se ha descrito que uno de los mecanismos de acción de Trastuzumab es disminuir la proliferación celular, a través de reclutar a la fosfatasa PTEN en membrana, resultando en la desfosforilación e inactivación de la vía PI3K/Akt (Longva et al., 2005). En estudios posteriores, sería interesante analizar el efecto de la administración del medicamento en las fosfatasas que regulan la vía de señalización de Akt.

6.7 Conclusiones

El silenciamiento de la fosfatasa PTEN aumenta la fosforilación de Akt, en mayor medida que otras fosfatasas evaluadas.

El silenciamiento PHLPP2 e INPP4b por sí solo no tienen un efecto importante, pero al disminuir la expresión de cada una de ellas en combinación con PTEN, el incremento en la fosforilación de Akt es mayor, mostrando un efecto sinérgico.

El silenciamiento de PHLPP2 resulta en un aumento en la fosforilación de Akt en el sitio T308, detectable por inmunofluorescencia.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*)

ADCP: fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (*antibody-dependent celular phagocytosis*)

ALT: alaninaaminotransferasa

AR: amfiregulina

BTC: betacelulina

CGMH: concentración globular media de hemoglobina

CK: creatina cinasa

ECG: electrocardiograma

EGF: factor de crecimiento epidermal (*epidermal growth factor*)

EGFR: factor de crecimiento epidérmico, (*epidermal growth factor*)

ELISA: 'ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immuno sorbent assay*)

EPR: epirregulina

FA: fosfatasa alcalina

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*)

FISH: hibridación fluorescente *in situ*

GAGs: glucosaminoglicanos

HER-2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2*)

IFN γ : interferón gamma.

IGF1: factor de crecimiento similar a la insulina-1 (*insulin-like growth factor-1*)

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleucina

INPP4B: *inositol polyphosphate 4-phosphatase*

LB: linfocitos B

LT: linfocitos T

MAC: complejo de ataque a membrana (*membrane attack complex*)

MAPK: MAP Kinase

MEC: matriz extracelular.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)

MMP's: metaloproteasas

NK: *natural killer*

NRG: neorregulina

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor*)

PHLPP1/2: *pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1/2*

PI3K: fosfoinositide 3-kinase

PNH: primates no humanos

PRRs: receptores reconocedores de patrones (*pattern-recognition receptors*)

PTEN: *Phosphatase and Tensin homology protein on chromosome 10*

SPF: libres de patógenos específicos (*specific pathogen free*)

TGF α : factor de crecimiento transformante alfa (*transforming growth factor alpha*)

TNF β : factor de necrosis tumoral tipo beta (*tumor necrosis factor beta*)

TUNEL: *TdT- mediated dUTP Nick end labelling*

VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*)

VGM: volumen glomerular medio.

LITERATURA CITADA

- AGOULNIK, I. U., HODGSON, M. C., BOWDEN, W. A. & ITTMANN, M. M. 2011. INPP4B: the new kid on the PI3K block. *Oncotarget*, 2, 321-8.
- ALBANELL, J., CODONY, J., ROVIRA, A., MELLADO, B. & GASCON, P. 2003. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol*, 532, 253-68.
- ALBERTS, B. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. United States. 5th edn. 928-931, 1178-1195, 1241-1246.
- ALEXÁNDER, B. D. 2003. Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *MEDISAN*, 7, 75-88.
- ALROY, I. & YARDEN, Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*, 410, 83-6.
- AUSTIN, C. D., DE MAZIERE, A. M., PISACANE, P. I., VAN DIJK, S. M., EIGENBROT, C., SLIWKOWSKI, M. X., KLUMPERMAN, J. & SCHELLER, R. H. 2004. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell*, 15, 5268-82.
- BARRERA-RODRIGUEZ, R., PERALTA-ZARAGOZA, O. & MADRID-MARINA, V. 1995. [Molecular bases of cancer immunology]. *Salud Publica Mex*, 37, 344-53.
- BERTUCCI, M. C. & MITCHELL, C. A. 2013. Phosphoinositide 3-kinase and INPP4B in human breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1280, 1-5.
- BISCHOFF, A., HUCK, B., KELLER, B., STROTBEEK, M., SCHMID, S., BOERRIES, M., BUSCH, H., MULLER, D. & OLAYIOYE, M. A. 2014. miR149 functions as a tumor suppressor by controlling breast epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res*, 74, 5256-65.
- BROGNARD, J. & NEWTON, A. C. 2008. PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 223-30.
- BROGNARD, J., SIERECKI, E., GAO, T. & NEWTON, A. C. 2007. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*, 25, 917-31.
- BUYS, J. 2007. Interpretación básica de inmunohistoquímica, características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Patología, Revista Latinoamericana*, 45, 126-140.

- CDER, C. F. D. E. A. R. 1996. Guidance for Industry Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals.
- CELLTRION. 2014. *Celltrion's Herxuma (trastuzumab) Receives Korea MFDS Approval* [Online]. http://www.celltrion.com/en/company/notice_view.asp?id=425&code=ennews&intNowPage=1&menu_num=&align_year=all. [Accessed 04/01/2015].
- CLYNES, R. A., TOWERS, T. L., PRESTA, L. G. & RAVETCH, J. V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, 6, 443-6.
- COBLEIGH, M. A., VOGEL, C. L., TRIPATHY, D., ROBERT, N. J., SCHOLL, S., FEHRENBACHER, L., WOLTER, J. M., PATON, V., SHAK, S., LIEBERMAN, G. & SLAMON, D. J. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, 17, 2639-48.
- COFEPRIS 2013. *Lineamientos que deberán cumplir los medicamentos biotecnológicos biocomparables*. [Online] [http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents Mol%C3%A9culas%20Nuevas/Lineamientos%20Medicamentos%20Biocomparables%20CMN%2023Mar12.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/Mol%C3%A9culas%20Nuevas/Lineamientos%20Medicamentos%20Biocomparables%20CMN%2023Mar12.pdf). [Accessed 04/01/2015].
- CHAPMAN, K., PULLEN, N., GRAHAM, M. & RAGAN, I. 2007. Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance. *Nat Rev Drug Discov*, 6, 120-6.
- DE VISSER, K. E., EICHTEN, A. & COUSSENS, L. M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6, 24-37.
- DENARDO, D. G. & COUSSENS, L. M. 2007. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 9, 212.
- DETWEILER, D. K. 2010. The mammalian electrocardiogram: comparative features. In: SPRINGER (ed.) *Comprehensive Electrocardiology*. 2th ed. Vol 1. 1924-1928.
- DRANOFF, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4, 11-22.
- EMEA, E. M. A. 2005. Scientific Discussion: Herceptin.
- FAUL, F., ERDFELDER, E., LANG, A. G. & BUCHNER, A. 2007. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*, 39, 175-91.
- FDA, F. A. D. A. 2003. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients*. [Online] <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM222779.pdf>. [Accessed 02/01/2015].

- FEDELE, C. G., OOMS, L. M., HO, M., VIEUSSEUX, J., O'TOOLE, S. A., MILLAR, E. K., LOPEZ-KNOWLES, E., SRIRATANA, A., GURUNG, R., BAGLIETTO, L., GILES, G. G., BAILEY, C. G., RASKO, J. E., SHIELDS, B. J., PRICE, J. T., MAJERUS, P. W., SUTHERLAND, R. L., TIGANIS, T., MCLEAN, C. A. & MITCHELL, C. A. 2010. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 22231-6.
- FREUND J.E., MILLER M., 2008. *Estadística Matemática con Aplicaciones*. Prentice-Hall. 6ª Edición. 246-359.
- GENETECH., B. A. 2013. Rituxan [package insert]. *In*: C.A., S. S. F. (ed.).
- GILL, P. S. 2000. A robust mixed linear model analysis for longitudinal data. *Stat Med*, 19, 975-87.
- GONZÁLEZ, L. 2007. Cáncer de mama: HER2/neu, métodos diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol*, 11, 40-57.
- GRACIA., G. T. 1996. Nuevo Bioterio en el conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM. . *Animales de Experimentación*, 2, 24-25.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANSEL, T. T., KROPSHOFER, H., SINGER, T., MITCHELL, J. A. & GEORGE, A. J. 2010. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 325-38.
- HARLAN LABORATORIES. 2009. *Athymic Nude Mouse* [Online]. www.harlan.com. [Accessed 20/12/2014].
- HEERING, J., ERLMANN, P. & OLAYIOYE, M. A. 2009. Simultaneous loss of the DLC1 and PTEN tumor suppressors enhances breast cancer cell migration. *Exp Cell Res*, 315, 2505-14.
- HOLLIDAY, D. L. & SPEIRS, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13, 215-224. .
- HOMMELGAARD, A. M., LERDRUP, M. & VAN DEURS, B. 2004. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell*, 15, 1557-67.
- HWANG, W. Y. & FOOTE, J. 2005. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 36, 3-10.
- HYNES, N. E. & MACDONALD, G. 2009. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 177-84.

- IBANEZ-CONTRERAS, A., HERNANDEZ-GODINEZ, B., REYES-PANTOJA, S. A., JIMENEZ-GARCIA, A., SOLIS-CHAVEZ, S. A., SUAREZ-GUTIERREZ, R. & GALVAN-MONTANO, A. 2013. Changes in blood parameters in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) during the first trimester of gestation. *J Med Primatol*, 42, 171-6.
- IBÁÑEZ-CONTRERAS, A. 2011. A clinical evaluation in geriatric rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): through serological studies and physiological constants in captivity. *JAVA*, 10, 3281-3286.
- IZUMI, Y., XU, L., DI TOMASO, E., FUKUMURA, D. & JAIN, R. K. 2002. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 416, 279-80.
- JAVOIS, L. C. 2010. *Inmunocytochemical methods and protocols (methods in molecularbiology)*. Trends Cell Biol. Cambridge,UK: Elsevier Science Publishers. 332-337.
- JUNUTULA, J. R., FLAGELLA, K. M., GRAHAM, R. A., PARSONS, K. L., HA, E., RAAB, H., BHAKTA, S., NGUYEN, T., DUGGER, D. L., LI, G., MAI, E., LEWIS PHILLIPS, G. D., HIRARAGI, H., FUJI, R. N., TIBBITTS, J., VANDLEN, R., SPENCER, S. D., SCHELLER, R. H., POLAKIS, P. & SLIWKOWSKI, M. X. 2010. Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 16, 4769-78.
- KELLY, K. J., SANDOVAL, R. M., DUNN, K. W., MOLITORIS, B. A. & DAGHER, P. C. 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C1309-18.
- KIM, H., MULLER, W. J. 1999. The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res*, 253, 78-87.
- LANGE, T., NENTWICH, M. F., LUTH, M., YEKEBAS, E. & SCHUMACHER, U. 2011. Trastuzumab has anti-metastatic and anti-angiogenic activity in a spontaneous metastasis xenograft model of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 308, 54-61.
- LEWIS PHILLIPS, G. D., LI, G., DUGGER, D. L., CROCKER, L. M., PARSONS, K. L., MAI, E., BLATTLER, W. A., LAMBERT, J. M., CHARI, R. V., LUTZ, R. J., WONG, W. L., JACOBSON, F. S., KOEPPEN, H., SCHWALL, R. H., KENKARE-MITRA, S. R., SPENCER, S. D. & SLIWKOWSKI, M. X. 2008. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*, 68, 9280-90.
- LONGVA, K. E., PEDERSEN, N. M., HASLEKAS, C., STANG, E. & MADSHUS, I. H. 2005. Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int J Cancer*, 116, 359-67.

- MACOR, P. & TEDESCO, F. 2007. Complement as effector system in cancer immunotherapy. *Immunol Lett*, 111, 6-13.
- MALHOTRA, G. K., ZHAO, X., BAND, H. & BAND, V. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*, 10, 955-60.
- MENARD, S., CASALINI, P., CAMPIGLIO, M., PUPA, S. M. & TAGLIABUE, E. 2004. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci*, 61, 2965-78.
- MENARD, S., PUPA, S. M., CAMPIGLIO, M. & TAGLIABUE, E. 2003. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*, 22, 6570-8.
- MSKCC, M. S. K. C. C. 2014. *SKBR-3: Human Breast Cancer Cell Line* [Online]. <http://www.mskcc.org/research/tangible-material/human-breast-cell-line-sk-br-3>. [Accessed 20/12/14 2014].
- NELSON, D. L., KURMAN, C. C. & SERBOUSEK, D. E. 2001. ⁵¹Cr release assay of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). *Curr Protoc Immunol*, Chapter 7, Unit 7 27.
- NINGYAN, Z. 2011. Glycoengineered Pichia produced anti-HER2 is comparable to trastuzumab in preclinical study. *Landes Bioscience*, 3, 289-298.
- NORDSTROM, J. L., GORLATOV, S., ZHANG, W., YANG, Y., HUANG, L., BURKE, S., LI, H., CICCARONE, V., ZHANG, T., STAVENHAGEN, J., KOENIG, S., STEWART, S. J., MOORE, P. A., JOHNSON, S. & BONVINI, E. 2011. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties. *Breast Cancer Res*, 13, R123.
- OLAYIOYE, M. A., NEVE, R. M., LANE, H. A. & HYNES, N. E. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19, 3159-67.
- ORTIZ-HIDALGO, C. 1994. Angiogénesis Tumoral. *Patología*, 32, 43-48.
- PANIZO, S. 1997. Estudio de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL. *Revista española de Patología*, 30.
- PARK, E., CHO, M. & KI, C. S. 2009. Correct use of repeated measures analysis of variance. *Korean J Lab Med*, 29, 1-9.
- PIO, R., AJONA, D. & LAMBRIS, J. D. 2013. Complement inhibition in cancer therapy. *Semin Immunol*, 25, 54-64.
- PUGSLEY, M. K., AUTHIER, S. & CURTIS, M. J. 2008. Principles of safety pharmacology. *Br J Pharmacol*, 154, 1382-99.
- QIAO, M., IGLEHART, J. D. & PARDEE, A. B. 2007. Metastatic potential of 21T human breast cancer cells depends on Akt/protein kinase B activation. *Cancer Res*, 67, 5293-9.

- REN, W., LIU, Y., WAN, S., FEI, C., WANG, W., CHEN, Y., ZHANG, Z., WANG, T., WANG, J., ZHOU, L., WENG, Y., HE, T. & ZHANG, Y. 2014. BMP9 inhibits proliferation and metastasis of HER2-positive SK-BR-3 breast cancer cells through ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. *PLoS One*, 9, e96816.
- RIESE, D. J., 2ND & STERN, D. F. 1998. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, 20, 41-8.
- ROCHE, H.-L. 2010. Product Monograph ^{PR}Herceptin, Pharmaceutical standard professed Antineoplastic.
- ROY, V. & PEREZ, E. A. 2009. Beyond trastuzumab: small molecule tyrosine kinase inhibitors in HER-2-positive breast cancer. *Oncologist*, 14, 1061-9.
- SAMPATH, L., KWON, S., KE, S., WANG, W., SCHIFF, R., MAWAD, M. E. & SEVICK-MURACA, E. M. 2007. Dual-labeled trastuzumab-based imaging agent for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in breast cancer. *J Nucl Med*, 48, 1501-10.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SHAPIRO, A. 1990. Testing and Estimation of Equal Variances for Correlated Variables *Statistics and Probability Letters*. 10, 231-234.
- SHI, Y., FAN, X., DENG, H., BREZKI, R. J., RYCYZYN, M., JORDAN, R. E., STROL, W. R., ZOU, Q., ZHANG, N., AN, Z. 2015. Trastuzumab triggers phagocytic killing of high HER2 cancer cells in vitro and in vivo by interaction with FcγR receptors on macrophages. *J immunol*. pii: 1402891 [Epub ahead to print]
- SWANN, J. B. & SMYTH, M. J. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*, 117, 1137-46.
- TABRIZI, M. A. & ROSKOS, L. K. 2007. Preclinical and clinical safety of monoclonal antibodies. *Drug Discov Today*, 12, 540-7.
- URBANO-MORAL, J. L.-H. J. 2011. Trastuzumab-related cardiotoxicity in women with breast cancer. *Cardiocyte*, 46, 33-35.
- WEINBERG, R. 2013. *The Biology of Cancer*. 2^{da} edición. United States. 109-111, 750-757.
- WHO, W. H. O. 2015. *Breast Cancer: prevention and control* [Online]. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. [Accessed 05/01/2015].
- WILSON, J. P., SOLIMANDO, D. A., JR. & EDWARDS, M. S. 1986. Parenteral benzyl alcohol-induced hypersensitivity reaction. *Drug Intell Clin Pharm*, 20, 689-91.

XU, Y. M., WANG, L. F., JIA, L. T., QIU, X. C., ZHAO, J., YU, C. J., ZHANG, R., ZHU, F., WANG, C. J., JIN, B. Q., CHEN, S. Y. & YANG, A. G. 2004. A caspase-6 and anti-human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) antibody chimeric molecule suppresses the growth of HER2-overexpressing tumors. *J Immunol*, 173, 61-7.

YAKES, F. M., CHINRATANALAB, W., RITTER, C. A., KING, W., SEELIG, S. & ARTEAGA, C. L. 2002. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt 1s required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*, 62, 4132-41.

YITNOSUMARTO, S. 1986. On Levene's tests of variance homogeneity. *australian Journal of Statistics*, 28, 230-241.