



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE FARMACOCINÉTICA DE PRODUCTOS CONTENIENDO
ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE EN RATAS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JUAN LUIS GUTIÉRREZ VELÁZQUEZ

TUTORA: DRA. HELGI HELENE JUNG COOK

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE FARMACOCINÉTICA DE PRODUCTOS CONTENIENDO
ERITROPYETINA HUMANA RECOMBINANTE EN RATAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JUAN LUIS GUTIÉRREZ VELÁZQUEZ



TUTORA: DRA. HELGI HELENE JUNG COOK
MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE 2016

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	M. en C. Juan Manuel Rodríguez
PRIMER VOCAL	Dra. María Estela Meléndez Camargo
SEGUNDO VOCAL	Dra. Raquel López Arellano
TERCER VOCAL	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
SECRETARIA	Dra. Inés Fuentes Noriega

Tutora

Dra. Helgi Helene Jung Cook

Sustentante

Q.F.B. Juan Luis Gutiérrez Velázquez

Dedicatoria

A Dios

A las mujeres de mi vida; mi madre y mis hermanas ¡Las amo!

A mi abuelita Juanita

Agradecimientos

A Dios

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo al proyecto "CONACyT 2012 CB 179118" y por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado con número de becario 336122.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios por todos los años que llevo de dentro de sus aulas, por las grandes experiencias que he podido vivir en ésta ¡mi Universidad! y por el conocimiento que mediante sus profesores compartí conmigo.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por estos dos años de conocimientos y aprendizajes, por el apoyo para la asistencia y presentación del trabajo "Implementación de pruebas de control de calidad y disolución de parches transdérmicos conteniendo nicotina" durante el XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas.

A la Dra. Helgi Helene Jung Cook por su asesoría y ayuda durante la realización de este proyecto, más aún por su apoyo íntegro como persona. Gracias por los conocimientos compartidos y las experiencias que he recibido.

A los miembros de mi jurado, la Dra. María Estela Melendez Camargo, Dra. Raquel López Arellano, Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, Dra. Inés Fuentes Noriega y al M en C. Juan Manuel Rodríguez por sus enriquecedoras aportaciones a esta tesis.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano y a la M en C. Patricia Miranda Cruz por su ayuda con el análisis de muestras por citometría de flujo.

Al personal del Bioterio UNEXA de la Facultad de Química, M en C. Marisol Rivero, MVZ María del Carmen Marín Alcocer y MVZ Karina López Olvera, por su gran colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A mi mamá por ser mi apoyo incondicional en cada paso a la superación, por tener siempre su confianza en mí, por ser la mujer en la que siempre podré confiar, simplemente por ser la mujer que me dio la vida.

A mi papá, por apoyarme durante todo el tiempo de mis estudios, por enseñarme lo que es ser responsable en la escuela, en el trabajo y sobre todo en la vida.

A mis hermanas Rosa María, Mariana y Brenda, quienes son mis mejores confidentes pero a veces también los más críticos jueces, por todos los momentos en los que hemos compartido trabajo, risas, pláticas, tristezas y llantos. Por que ser hermanos es uno de los vínculos más fuertes, y doy gracias por tenerlas.

A mis amigas incondicionales Irma Badillo y Karen López, conocidas desde hace más de la mitad de mi vida, que hemos compartido tantos momentos juntos y ahora nuevas etapas que han comenzado en nuestras vidas. Gracias por su amistad.

A mis amigos Mariana Villegas, Monserrat Landa, Alejandra Hernández, Sofía Lecona, Verónica Rodríguez y Fernando Robles, por ser los primeros en estar conmigo durante la licenciatura y porque, aunque nos vemos poco, sé que siempre van a estar presentes.

A la familia que he creado en la Universidad, Berenice Álvarez, Carolina Rivera, Libier Cabrera, José Becerril y Esteban Aguayo, por estar en los momentos de exámenes complicados, por los momentos buenos y malos que pasamos durante la licenciatura y que seguiremos pasando mientras siga nuestra amistad, porque en verdad han llegado a ser una segunda familia, por ser mis QFB's preferidos.

A los amigos encontrados durante la etapa del posgrado Marcela Aguilar, Cecilia Meza, Nidia Barragan, Claudia Vences, Karina Mendoza, Carolina Neira, Ulises Sánchez y Hugo Salazar, quienes estuvieron en los retos que represento el posgrado, por sus consejos y confianza durante esta etapa de mi vida.

A Sergio Soto y Brenda Evangelista, grandes personas que la vida puso frente a mí para acompañarme durante esta etapa y que espero sigan a mi lado por un largo tiempo, por todas esas travesuras, sonrisas, momentos de presión y angustia que pasamos en el laboratorio.

A toda mi familia, tíos y primos en general, quienes me han apoyado en momentos complicados y también en momentos de mucha alegría, gracias por todos sus consejos, sabias palabras y hospedaje cuando fue necesario. Por que ser parte de esta familia es de lo más hermoso que me pudo suceder.

A todas las amistades que he sembrado en mí paso por esta vida, a todas aquellas personas que me he cruzado en este camino y que han aportado a mi aprendizaje.

Una mención especial a un gran compañero de vida Jose Guadalupe Becerril Vega, porque te debo tanto, por los grandes momentos que vivimos juntos y espero podamos seguir compartiendo muchos otros. Sabes que sin tu apoyo y compañía esto no hubiera sido posible, eres uno de los grandes.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 112 del departamento de Farmacia en el conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice general

Índice general	i
Índice de figuras	iii
Índice de tablas.....	iv
Índice de gráficas.....	vi
Símbolos y abreviaturas	vii
1. Introducción	1
2. Antecedentes / Marco teórico.....	3
2.1 Medicamentos biotecnológicos.....	3
2.1.1 Producción de medicamentos biotecnológicos	5
2.2 Medicamentos biocomparables	6
2.2.1 Regulación de medicamentos biocomparables.....	8
2.3.1. El eritrocito	10
2.3.2 Eritropoyetina	11
2.3.2.1 Receptor de eritropoyetina	13
2.3.2.2 Mecanismo de acción	14
2.3.3 Agentes estimuladores de la eritropoyesis.....	16
2.3.4 Eritropoyetina humana recombinante	17
2.3.4.1 Indicación terapéutica.....	19
2.3.4.2 Reacciones adversas	20
2.3.5 Farmacocinética	21
2.3.5.1 Evaluación de farmacocinética en animales	22
2.3.6 Pruebas farmacopeicas para eritropoyetina humana recombinante.....	24
2.3.6.1 Evaluación de potencia en animales.....	26
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos particulares	28
4. Desarrollo experimental	29
4.1 Reactivos, materiales y equipos	29
4.1.2 Reactivos.....	29
4.1.3 Materiales.....	29
4.1.4 Equipos e instrumentos	29
4.2 Medicamentos	30
4.3 Soluciones.....	30
4.3.1 Solución de hidróxido de sodio	30
4.3.2 Solución de ácido fosfórico	30
4.3.3 Solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2.....	31
4.4 Estudio de la potencia relativa de eritropoyetina en ratones Balb/c	31
4.4.1 Preparación de soluciones de medicamentos para la determinación de potencia relativa a dosis de 10 UI, 20 UI y 40 UI.....	31
4.4.1.1 Preparación de solución del medicamento de referencia.....	31
4.4.1.2 Preparación de solución del medicamento de prueba.....	32
4.4.1.3 Preparación de las soluciones de los medicamentos bajo estudio con concentración de [20 UI / 250 µL] y [10 UI / 250 µL].....	32

4.4.2	Preparación de soluciones de medicamentos para la determinación de potencia relativa a dosis de 40 UI, 80 UI y 160 UI	33
4.4.2.1	Preparación de solución del medicamento de referencia	33
4.4.2.2	Preparación de solución del medicamento de prueba	33
4.4.2.3	Preparación de las soluciones de los medicamentos bajo estudio a concentración de [80 UI / 250 µL] y [40 UI / 250 µL]	33
4.4.3	Administración de los medicamentos	34
4.4.4	Tinción de muestras con naranja de tiazol	36
4.4.5	Cuantificación y análisis por citometría de flujo	37
4.4.6	Cálculo de potencia relativa	38
4.5	Estudio de farmacocinética en ratas Wistar	40
4.5.1	Preparación de la solución de medicamento de referencia a concentración de 135 UI / 250 µL	40
4.5.2	Preparación de la solución de medicamento de prueba a concentración de 135 UI / 250 µL	40
4.5.3	Estudio <i>in vivo</i>	40
4.5.4	Toma de muestras	41
4.5.5	Cuantificación de eritropoyetina	42
4.5.5.1	Preparación del buffer de lavado	43
4.5.5.2	Preparación de solución sustrato	43
4.5.5.3	Preparación de puntos control [75 mUI / mL] y [7.5 mUI / mL]	43
4.5.5.4	Análisis de las muestras plasmáticas	43
4.5.6	Parámetros farmacocinéticos	45
4.6	Análisis estadístico	45
5.	Resultados y discusión	46
5.1	Evaluación de potencia relativa a dosis de 10 UI, 20 UI y 40 UI	46
5.2	Evaluación de potencia relativa a dosis de 40 UI, 80 UI y 160 UI	48
5.3	Estudio de farmacocinética de eritropoyetina	53
5.4	Relación entre farmacocinética y potencia de los productos	59
6.	Conclusiones	62
7.	Perspectivas	63
8.	Referencias	64
Anexos	71

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de producción de medicamentos biotecnológicos (Amgen, 2014)	6
Figura 2. Fuentes de variabilidad entre biotecnológico innovador y biocomparables debidas al proceso de producción.....	7
Figura 3. Formación de eritrocitos.....	11
Figura 4. Estructura de eritropoyetina humana	13
Figura 5. Estructura del receptor de eritropoyetina	14
Figura 6. Importancia de la eritropoyetina durante la eritropoyesis	15
Figura 7. Vías de señalización activadas por la unión de eritropoyetina a su receptor....	16
Figura 8. Diagrama del procedimiento para el ensayo de ELISA	44
Figura 9. Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de los productos bajo estudio.....	58

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación entre los fármacos de síntesis química y los biotecnológicos.....	4
Tabla 2. Productos biocomparables autorizados en la Unión Europea	8
Tabla 3. Agentes estimulantes de la eritropoyesis	17
Tabla 4. Medicamentos innovadores y biocomparables conteniendo eritropoyetina humana recombinante	18
Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de una administración intravenosa	21
Tabla 6. Comparación de parámetros farmacocinéticos entre medicamentos conteniendo EPOrh alfa y beta en humanos	22
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos en diferentes especies animales tras una administración intravenosa	23
Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos en diferentes especies animales tras una administración subcutánea	23
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de EPOCIM a tres diferentes dosis y el producto de referencia.....	23
Tabla 10. Pruebas farmacopeicas para biofármaco y biomedicamento conteniendo EPO25	
Tabla 11. Preparación de las soluciones a administrar de los medicamentos bajo estudio	32
Tabla 12. Preparación de las soluciones a administrar de los medicamentos bajo estudio	34
Tabla 13. Estudio 1. Dosis de EPOrh por grupo experimental primer intervalo de dosis ..	35
Tabla 14. Estudio 2. Dosis de EPOrh por grupo experimental segundo intervalo de dosis	35
Tabla 15. Estudio 1. Reasignación de grupos post-administración de medicamentos.....	35
Tabla 16. Estudio 2. Reasignación de grupos post-administración de medicamentos.....	36
Tabla 17. Administración de medicamentos para la evaluación farmacocinética	41
Tabla 18. Tiempos de muestreo tomados a las ratas de cada grupo para conformar los perfiles farmacocinéticos	42
Tabla 19. Dilución de las muestras de plasma	44
Tabla 20. Porcentaje de reticulocitos obtenidos para el medicamento de referencia	46
Tabla 21. Porcentaje de reticulocitos obtenidos para el medicamento de prueba	46
Tabla 22. ANOVA multifactorial para determinar la significancia del medicamento.....	47
Tabla 23. ANOVA para determinar la validez del modelo de líneas paralelas en el intervalo de dosis bajas.....	48
Tabla 24. Porcentaje de reticulocitos obtenidos por el medicamento de referencia	49
Tabla 25. Porcentaje de reticulocitos obtenidos por el medicamento de prueba	49
Tabla 26. ANOVA multifactorial para determinar la significancia del medicamento.....	49
Tabla 27. ANOVA para determinar la validez del modelo de líneas paralelas en el intervalo de dosis altas.....	51
Tabla 28. ANOVA multifactorial de la variabilidad de la respuesta entre días	51
Tabla 29. ANOVA multifactorial del intervalo de dosis bajas.....	52
Tabla 30. ANOVA multifactorial del intervalo de dosis altas	52
Tabla 31. Resultado de la prueba HSD Tukey para dosis bajas	53

Tabla 32. Resultado de la prueba HSD Tukey para dosis altas	53
Tabla 33. Resultados de % Desviación utilizando el modelo lineal y el modelo log-log....	54
Tabla 34. Parámetros farmacocinéticos del medicamento de referencia.....	56
Tabla 35. Parámetros farmacocinéticos para el producto de prueba.....	56
Tabla 36. Cuantificación de reticulocitos para el intervalo de dosis de 10 - 40 UI	73
Tabla 37. Cuantificación de reticulocitos para el intervalo de dosis de 40-160 UI	73

Índice de gráficas

Gráfica 1. Linealidad de dosis con respecto al ABC de EPOCIM en administración intravenosa	24
Gráfica 2. Tamaño altura vs tamaño área	37
Gráfica 3. Tamaño área vs complejidad.....	37
Gráfica 4. Histograma biparámetro de la autofluorescencia	38
Gráfica 5. Histograma ratón 16 dosis 40 UI Recormon	38
Gráfica 6. Porcentaje de reticulocitos producido para los dos medicamentos	47
Gráfica 7. Porcentaje de reticulocitos producidos por los dos medicamentos	49
Gráfica 8. Curvas generadas por el medicamento de referencia en ambos rangos de dosis	52
Gráfica 9. Curva de calibración típica obtenida con el modelo log-log	54
Gráfica 10. Perfil farmacocinético promedio del producto de referencia.....	55
Gráfica 11. Perfil farmacocinético promedio del producto de prueba	55
Gráfica 12. Comparación de perfiles entre productos	57

Símbolos y abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
ABCinf	Área bajo la curva extrapolada al infinito
ABCt	Área bajo la curva al último tiempo de muestreo
ANOVA	Análisis de varianza
BFU-E	Unidad formadora de brotes eritroides
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
CHO	Células de ovario de hamster chino
CI	Depuración
C_{máx}	Concentración plasmática máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
Da	dalton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPO	Eritropoyetina
EPOrh	Eritropoyetina humana recombinante
F	Fracción absorbida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FER	Factor eritropoyético renal
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
Hb	Hemoglobina
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>

ka	Constante de absorción
KDa	Kilodalton
ke	Contante de eliminación
OMS	Organización Mundial de la Salud
PRCA	Aplasia pura de células rojas
RIS	Reglamento de Insumos para la Salud
SN0	Células no secretoras
SSA	Secretaría de Salud
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
T_{máx}	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
TMR	Tiempo medio de residencia
UI	Unidad Internacional
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida
Vd	Volumen de distribución
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Introducción

Los medicamentos biotecnológicos son productos de tipo protéico desarrollados por ingeniería genética. En general corresponden a proteínas o polipéptidos que han sido sintetizados por un organismo vivo modificado a través de tecnología ADN recombinante. Estos medicamentos representan una opción innovadora para el tratamiento de enfermedades crónicas y degenerativas que afectan a la población mundial, como son: diabetes *mellitus*, artritis reumatoides, esclerosis múltiple, etc. En México, el 35% de las solicitudes de nuevos registros de sustancias innovadoras, corresponden a moléculas derivadas de procesos biotecnológicos, especialmente para enfermedades relacionadas con cáncer y enfermedades reumatológicas y neurológicas (Miranda, 2013). De acuerdo con las estadísticas, se predice un incremento dramático en las ventas de medicamentos biotecnológicos para el año 2020 (Ozcagli, et al; 2015).

Los medicamentos biotecnológicos tienen un peso molecular mayor y una estructura más compleja que la presentada por los fármacos de síntesis química y dado que su producción se realiza en organismos vivos, las características y la calidad del biofármaco se ven afectadas por el proceso de manufactura.

A consecuencia del vencimiento de las patentes de los primeros medicamentos biotecnológicos, han surgido productos biotecnológicos no innovadores, a los cuales se les asignó en México, el término de biocomparables y buscan posicionarse en el mercado farmacéutico a un menor costo (Ozcagli, et al; 2015, Sekhon y Saluja, 2011). Sin embargo, la regulación de estos productos presenta un reto a superar, debido a que cada biotecnológico presenta sus particularidades y es importante establecer las pruebas a realizar para demostrar biocomparabilidad caso por caso.

La eritropoyetina humana recombinante, es un medicamento biotecnológico de origen protéico cuya actividad consiste en estimular las células progenitoras de los eritrocitos teniendo como objetivo un aumento en la cantidad de eritrocitos. Este medicamento está indicado para el tratamiento de la anemia asociada a insuficiencia renal crónica, y también después de ciclos de quimioterapia agresivos para tratamiento de cáncer o síndrome de inmunofeciciencia adquirida (SIDA). Igualmente se ha utilizado en casos de anemia en infantes de pretérmino y para programas de autotransfusión en cirugía programada (Jelkmann, 2013).

En México se venden seis productos no innovadores conteniendo eritropoyetina humana recombinante (EPOhr), de acuerdo a lo establecido en la NOM-257-SSA1-2014, en materia de medicamentos biotecnológicos, requieren asegurar su biocomparabilidad con respecto al medicamento de referencia. Actualmente se han emitido seis guías específicas de medicamentos biotecnológicos para demostrar su biocomparabilidad, sin embargo aún no se ha emitido una guía para eritropoyetina humana recombinante. Algunos parámetros de calidad indicados en la guía de la agencia de Estados Unidos de América conocida como food and drug administration (Quality considerations in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product) son: impurezas, caracterización de estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, detección de agregados y potencia, entre otros (Guidance for industry, scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product, 2015).

En un trabajo anterior realizado en el grupo de investigación, se encontró que algunos medicamentos conteniendo eritropoyetina humana recombinante (EPOrh) de venta en México, difieren en su potencia con respecto a un medicamento innovador. Por lo anterior, se consideró importante realizar un estudio de farmacocinética para determinar si las diferencias en potencia influían en la disposición de la eritropoyetina, así que, como objetivo se planteó realizar la potencia relativa entre un medicamento de prueba y el medicamento de referencia que contienen eritropoyetina humana recombinante, utilizando el método de líneas paralelas en ratones, el cual está indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; también la realización de farmacocinéticas de cada uno de los medicamentos en ratas Wistar.

2. Antecedentes / Marco teórico

2.1 Medicamentos biotecnológicos

Debido al creciente aumento de las enfermedades autoinmunes, crónico-degenerativas, así como de enfermedades como el cáncer (Zhou, et al; 2013), se está en búsqueda constante de nuevos tratamientos. Gracias a los avances científicos que se han tenido en las últimas décadas, se han desarrollado los medicamentos conocidos como biotecnológicos. Dichos productos han cobrado gran relevancia a nivel mundial, debido a su importancia en la prevención, diagnóstico, control y tratamiento de enfermedades crónicas de manera segura y eficaz (Mikhail y Farouk, 2013).

En México, el artículo 222 Bis de la Ley General de Salud define un medicamento biotecnológico como: “toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas” (Ley General de Salud, 2016).

Los medicamentos biotecnológicos pueden clasificarse en:

- I. Proteínas recombinantes
- II. Anticuerpos monoclonales
- III. Péptidos sintéticos
- IV. Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmidos
- V. Otros

Entendiéndose por otros a aquellos que determine mediante acuerdo la Secretaría, conforme a los avances técnicos y científicos (Reglamento de Insumos para la Salud, 2014).

Existen grandes diferencias entre los medicamentos de síntesis química y los biotecnológicos, desde el hecho estructural, pasando por las diferencias en estabilidad hasta la vía de administración (Franco y Savio, 2008). Por ejemplo, al hacer una comparación entre un farmoquímico como el paracetamol y un producto biotecnológico como la insulina, el paracetamol contiene tan sólo 20 átomos, pesando cerca de 151 Da,

su producción se realiza por síntesis química por lo que sus propiedades físicas y químicas como el punto de fusión de 170°C, el logP de 0.46 y su pKa de 9.38 están bien caracterizadas y es obtenido con alto grado de pureza, mientras que el biofármaco insulina posee en su estructura 788 átomos, presenta un peso de 5,800 Da con punto de fusión de 81°C y es sensible a cambios de pH. La insulina es obtenida a partir de bacterias transfectadas con el gen de insulina humana, su estructura primaria esta conformada por 51 aminoácidos y en su estructura terciaria tiene dos puentes disulfuro y es uno de los medicamentos biotecnológicos de menor tamaño, muy conocido y estudiado.

En la tabla 1 se muestran las diferencias entre ambos los medicamentos de origen biotecnológico y los de síntesis química.

Tabla 1. Comparación entre los fármacos de síntesis química y los biotecnológicos

Parámetro	Fármaco síntesis química	Fármaco biotecnológico
Estructura química	Relativamente sencilla Peso molecular bajo: 100-1,000 Da (No gran cantidad de átomos). Fácil de reproducir	Muy compleja Peso molecular alto: 10-300 kDa (Gran cantidad de átomos). Difícil de reproducir
Origen	Síntesis química o semisíntesis	A partir de organismos vivos: virus, bacterias, hongos, células animales o vegetales.
Caracterización	Se pueden caracterizar con cierta facilidad Se pueden obtener con alta pureza	Determinación de estructura compleja (debido a la conformación primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria) Difícil determinar propiedades fisicoquímicas No se pueden obtener altamente puros
Estabilidad	Muy estables	Lábiles a temperatura elevadas y cambios de pH Sufren oxidación, desaminación, agregación, adsorción, etc.
Toxicidad	Toxicidad específica No inmunogénicos	Toxicidad mediada por receptor Inmunogénico
Producción	Relativamente sencilla Fácil de reproducir No sensible a pequeños cambios en producción y el ambiente	Muy compleja Difícil de reproducir Sensible a pequeños cambios en producción y el ambiente

Modificada de Sekhon y Saluja 2011.

Con respecto a las vías de administración, los medicamentos conteniendo fármacos de síntesis química, pueden ser administrados por una gran variedad de rutas como las

enterales: oral, bucal, sublingual y rectal, las parenterales que incluyen vía intramuscular, subcutánea e intravenosa, u otras como la vía transdérmica e inhalatoria (Sultatos, 2007). En el caso de los medicamentos de origen biotecnológico, debido a que presentan baja estabilidad en las condiciones del tracto gastrointestinal, la vía de administración más utilizada es la parenteral, siendo las más comunes la administración subcutánea, la intramuscular y la intravenosa (Sultatos, 2007).

En la búsqueda de una vía más cómoda para los pacientes; en la actualidad se están investigando nuevas formulaciones de biotecnológicos. Por ejemplo, la formulación de un sistema de liberación pulmonar para un péptido, o el desarrollo de una formulación auto-nanoemulsificante para la administración de insulina por vía oral (Lassmann-Vague y Raccach, 2006, Yang, et al; 2013, Li, et al; 2014).

2.1.1 Producción de medicamentos biotecnológicos

Los medicamentos biotecnológicos se obtienen mediante procesos complejos de producción y el producto final obtenido es dependiente de cada una de las etapas de elaboración (Padilla, 2015). Se debe tener en cuenta que, para la producción de estos medicamentos se utilizan microorganismos o líneas celulares, a las cuales, se les ha realizado alguna modificación genética para obtener la molécula deseada y al ser organismos vivos presentan cierta variabilidad propia (Mikhail y Farouk, 2013).

A lo largo del tiempo, ha existido un gran avance en la tecnología para la producción de biotecnológicos, sin embargo, esto no garantiza que su producción sea idéntica de un lote a otro (WHO, 2014).

El proceso de producción puede dividirse en diferentes etapas, las cuales están representadas en la figura 1. Es fundamental, mantener el ambiente específico requerido por las células para seguir creciendo, esto se debe conservar en cada uno de los pasos del proceso. Los cambios sutiles pueden afectar a las células y alterar las proteínas que producen (Amgen, 2014).

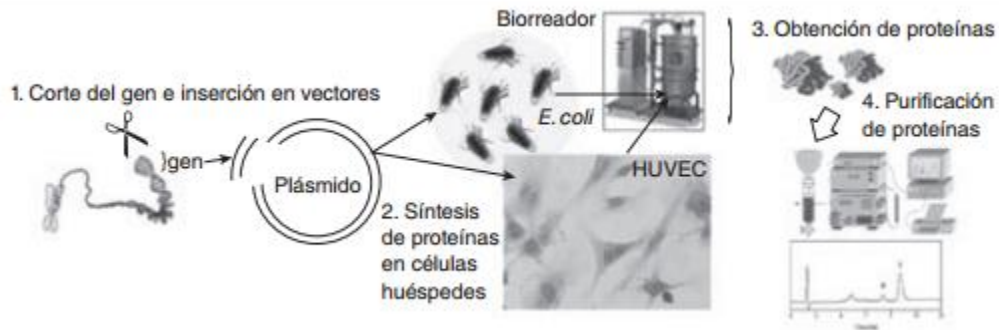


Figura 1. Proceso de producción de medicamentos biotecnológicos (Amgen, 2014)

Entre las líneas celulares comúnmente utilizadas, se encuentran las células de ovario de hamster chino (CHO) y las células no secretoras (SN0) así como microorganismos como la bacteria *E. coli*. El proceso íntegro, desde la creación del banco maestro de células, hasta la preparación para ser administrado a pacientes, requiere varios años debido al desarrollo y estudios requeridos para comprobar su eficacia y seguridad representando un costo de cientos de millones de euros (Amgen, 2014).

2.2 Medicamentos biocomparables

La creciente presión presupuestal para el cuidado de la salud, requería de análogos de los medicamentos a menor costo, lo que derivó en las versiones similares del producto innovador original. Y ahora, el mercado farmacéutico está abierto para las versiones similares de los productos biotecnológicos (Sekhon y Saluja, 2011). Esto ha podido darse, gracias a que las patentes de los primeros medicamentos biotecnológicos comenzaron a expirar en los años 2004-2008 (Martos-Rosa, et al; 2015).

En la actualidad, se ha dado entrada a los productos conocidos como biocomparables. Sin embargo, como se observa en la figura 2, pueden existir diferencias en metodología entre las compañías competidoras y el propietario natural de la línea de manufactura. Algunas alteraciones menores en el proceso de producción pueden ocasionar microheterogeneidad, lo cual es definido como cambios leves en la estructura molecular, estabilidad, comportamiento de la línea celular de producción, condiciones de crecimiento, vectores y procesos de purificación. Por esto, es que el proceso de creación de un biocomparable es todo un reto (Daller, 2015).

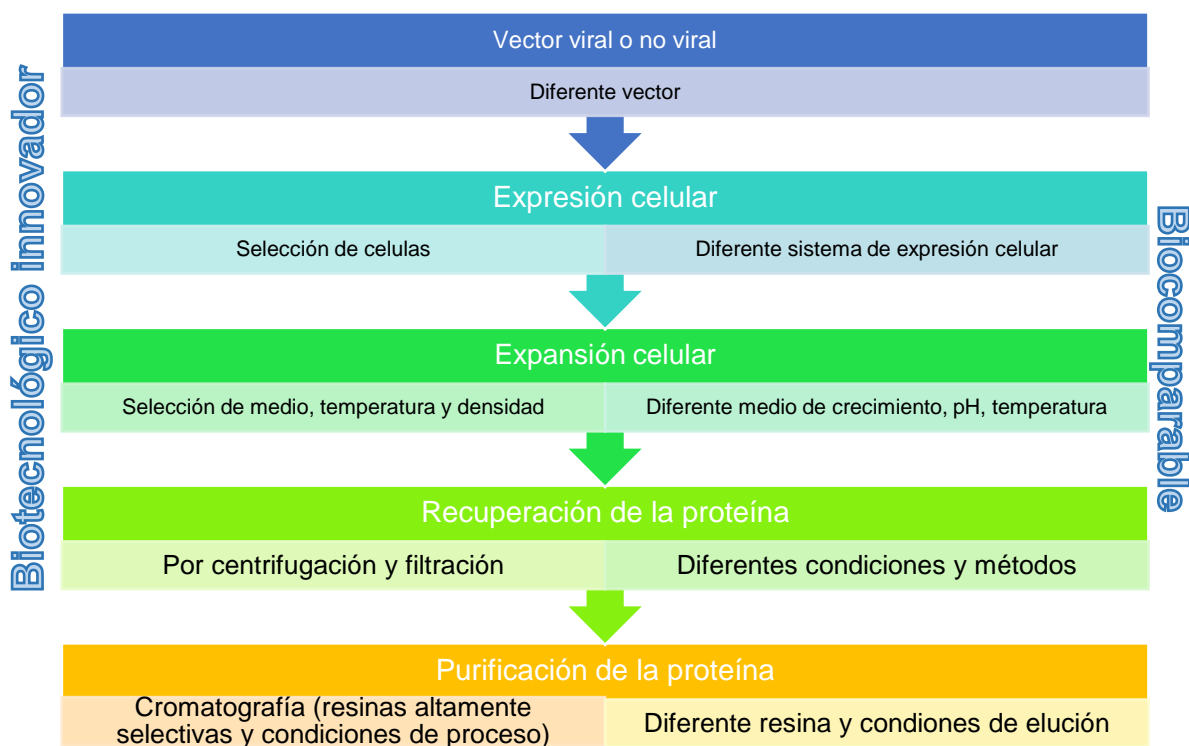


Figura 2. Fuentes de variabilidad entre biotecnológico innovador y biocomparables debidas al proceso de producción (Daller, 2015)

Debido a esta complejidad, es imposible obtener moléculas idénticas, pero si moléculas similares, por lo que a los medicamentos que contienen estas moléculas, no se le puede llamar genéricos (Martos-Rosa, et al; 2015). Consecuentemente, se han acuñado términos como “biosimilars” en Europa y adoptado también por la OMS, “follow-on biologics” en Estados Unidos y Japón, “Subsequent entry biologics” en Canadá y el término “biocomparables” es el oficial para México (Sekhon y Saluja, 2011). Por lo tanto, en la presente tesis se utilizará el término biocomparable según lo definido en la regulación mexicana.

Los medicamentos provenientes de fármacos de síntesis química, demuestran la intercambiabilidad entre el medicamento de prueba y el de referencia a través de estudios de bioequivalencia pudiendo ser este, una comparación de los perfiles farmacocinéticos, bajo la premisa que perfiles iguales producirán el mismo efecto farmacodinámico. Sin embargo, para los medicamentos biotecnológicos, éste paradigma no puede extrapolarse (Schellekens, 2005), por lo que se ha trabajado ampliamente, en tener marco regulatorio para la aprobación de biocomparables.

En la tabla 2, se muestran los medicamentos biocomparables que han sido autorizados hasta el momento en la Unión Europea. El primer y único medicamento aprobado como biocomparable en Estados Unidos de América es Filgrastim cuya marca es Zarxio de Sandoz. Este producto fue aprobado desde 2009 en la Unión Europea mientras que en Estados Unidos de América se aprobó en 2015.

Tabla 2. Productos biocomparables autorizados en la Unión Europea

Producto	Compañía	Año de aprobación
Insulina glargina	Eli Lilly	2014
Eritropoyetina alfa	Medice Arzneimittel Pütter	2007
Filgrastim	Accord Healthcare	2014
Folitropina alfa	Finox Biotech	2014
Eritropoyetina alfa	Sandoz	2007
Filgrastim	AbZ-Pharma	2008
Eritropoyetina alfa	Hexal	2007
Filgrastim	Hexal	2009
Filgrastim	Apotex	2013
Infliximab	Hospira	2013
Filgrastim	Hospira	2013
Somatropina	Sandoz	2006
Folitropina alfa	Teva Pharma	2013
Filgrastim	Ratiopharm	2008
Infliximab	Celltrion Healthcare	2013
Eritropoyetina zeta	Hospira	2007
Eritropoyetina zeta	Stada Arzneimittel	2007
Filgrastim	Teva	2008
Filgrastim	Sandoz	2009

Modificada de Daller, 2015.

2.2.1 Regulación de medicamentos biocomparables

Existen guías internacionales para evaluar la calidad de un medicamento biotecnológico, entre las que se encuentran las que ha publicado la European Medicine Agency (EMA), la Food and Drug Administration (FDA), Japanese Ministry of Health and Welfare e International Conference of Harmonization (ICH). Todas estas guías tienen como objetivo fundamental el asegurar el control durante el proceso de producción y la reproducibilidad

entre lotes conforme a las especificaciones del producto, siguiendo una caracterización completa (Meza, 2015).

Históricamente, la EMA fue la agencia reguladora que comenzó con la implementación de tratados generales sobre pruebas fisicoquímicas, estudios preclínicos, clínicos y pruebas de inmunogenicidad tanto para productos innovadores como para biocomparables. La publicación de guías para productos biocomparables inicia en el año 2003, un año antes de comenzar a vencer las patentes de los primeros biotecnológicos (EMA, 2016).

La Organización Mundial de la Salud también se ha dado a la tarea de emitir guías para la regulación de biocomparables, empezando con la emisión en abril de 2010 de la Guía para la evaluación de Bioterapéuticos Similares (WHO, 2016).

En el año 2012 la FDA, que es la agencia regulatoria en Estados Unidos de América, emite los primeros borradores de guías para la regulación de medicamentos biocomparables, en donde se incluyen consideraciones científicas y de la calidad en la demostración de biosimilitud. Pero no fue hasta el año 2015, con la aprobación de tres guías para demostrar “biosimilitud” que se comienzan a aceptar los medicamentos biocomparables. Las primeras Insulinas, tuvieron que presentar todas las pruebas que demostraran seguridad, eficacia y calidad al igual que el medicamento innovador.

Desde inicios del 2015, la FDA cuenta con un programa de Desarrollo de Biosimilares. A la fecha, se encuentran incluidos en este programa, 59 propuestas relacionadas con 18 medicamentos biotecnológicos (Woodcock, 2016).

De igual forma se ha considerado necesario, crear guías específicas para la evaluación de biocomparabilidad por biofármaco. Las primeras guías específicas fueron emitidas por la EMA en el año 2006, con las guías de insulina y somatropina. En tanto la OMS, emitió en marzo de 2016, el plan preliminar “Guía sobre la evaluación de anticuerpos monoclonales como medicamento biocomparable” (WHO, 2016).

En México, con la publicación del Artículo 222 Bis en junio de 2009, se inicia el camino a establecer la reglamentación de los biotecnológicos innovadores y biocomparables, para garantizar su seguridad y eficacia (Miranda, 2013). Actualmente ya se cuenta con lineamientos a los cuales deben apegarse los medicamentos biotecnológicos biocomparables, y la emisión de 6 guías específicas para demostrar biocomparabilidad.

Algunas normas en las cuales se incluyen a los medicamentos biotecnológicos y biocomparables son las siguientes:

- Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios.
- Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012, Instalación y operación de la Farmacovigilancia.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen estudios de biocomparabilidad.
- Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1-2014, En materia de medicamentos biotecnológicos.
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-073-SSA1-2014, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

2.3 Eritropoyetina. Generalidades

2.3.1. El eritrocito

Los eritrocitos son las células más abundantes en la sangre y su principal función es el transporte de oxígeno. Debido a su alto contenido de hemoglobina presentan el color rojo que los caracteriza. Estos pueden sufrir deformaciones que le permiten pasar a través de capilares con menor diámetro. De esta flexibilidad depende su vida media. El tiempo de vida en circulación desde su producción en la médula ósea hasta su destrucción es de aproximadamente 120 días (Novales y Amato, 2014). Al igual que todas las células de la sangre, estos provienen también de una célula indiferenciada (Figura 3); procediendo a la diferenciación en proeritroblasto, normoblasto, reticulocito y eritrocito (Alegre, 2005).

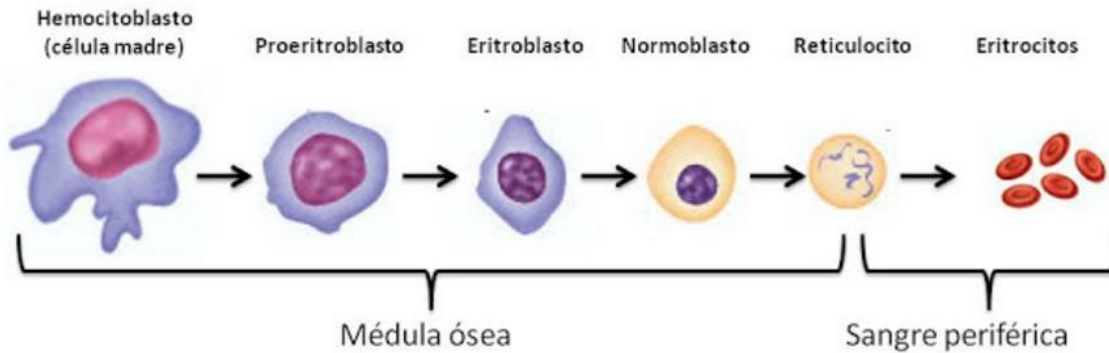


Figura 3. Formación de eritrocitos (Tomada de <http://saulvelazquez.blogspot.mx/2013/02/este-es-un-esquema-de-la-eritropoyesis.html>)

Para llevar a cabo su función, los eritrocitos requieren de la hemoglobina (Hb) y dado que son células terminales no requieren de la información genética que se encuentra en su núcleo. Por esto, para disponer de una mayor cantidad de Hb, el núcleo y otras estructuras citoplasmáticas son remplazadas por una solución altamente concentrada en hemoglobina (Novales y Amato, 2014, Palomo, 2009). Por no contener material genético, no sintetiza nuevas proteínas durante su vida media; al perder su núcleo deben tener sintetizadas todas las proteínas requeridas para su metabolismo durante este periodo (Novales y Amato, 2014).

Algunas funciones de los eritrocitos son (Palomo, 2009):

- Transportar Hb (la cual lleva oxígeno desde los pulmones a los tejidos).
- Transportar el CO₂ desde los tejidos a los pulmones, gracias a su contenido de anhidrasa carbónica.
- Son un excelente amortiguador ácido-base.

2.3.2 Eritropoyetina

La eritropoyetina es una hormona glucoproteica de forma esférica con peso molecular de 30.4 kDa. Es termoestable, no dializable y en la electroforesis se desplaza como una globulina alfa 2. Su actividad es óptima en un intervalo de pH entre 3 a 10. El origen de esta hormona no es muy claro hasta la actualidad, sin embargo, existen dos posibles teorías de la biosíntesis de la misma. La primera de ellas indica que se produce directamente en el aparato yuxtglomerular de los riñones, mientras que la segunda refiere a que en el riñón se produce una enzima denominada factor eritropoyético renal

(FER), que convierte a una sustancia plasmática biológicamente inactiva en eritropoyetina; se cree que el sustrato es una globulina alfa 1 producida en el hígado (Novales y Amato, 2014).

En 1977 Miyake y colaboradores purificaron y caracterizaron a la eritropoyetina humana de la orina de pacientes con anemia aplásica. Este fue el primer paso en el estudio de dicha hormona. En la actualidad, se conoce que es la principal hormona en la regulación de la eritropoyesis, y controla la maduración eritroide desde las células progenitoras (Jurado, et al; 2007).

El gen que codifica para eritropoyetina, posee 5 exones y se ubica en el brazo largo del cromosoma 7q11-22. La expresión del gen EPO es modulado por agentes fisiológicos y farmacológicos (Palomo, 2009). El principal estímulo que desencadena la expresión es la hipoxia, siendo otros la disminución de la hemoglobina en la sangre, el aumento de calcio intracelular, la liberación de insulina, la hipoglucemia, una alta temperatura y la disminución de la presión arterial (Jelkmann, 2011).

La eritropoyetina es un miembro del grupo de las citocinas de clase I. Esta hormona consiste en una proteína glicosilada. Terminada la traducción en el ribosoma, la eritropoyetina cuenta con 193 aminoácidos en su secuencia, después sufre una pérdida de 27 residuos en la parte amino terminal. Seguidamente, el residuo de arginina ubicado en la posición 166 unido por el carboxilo terminal, es hidrolizado por una carboxilpeptidasa quedando una proteína con 165 aminoácidos (Jurado, et al; 2007, Jelkmann, 2004). Dos puentes disulfuro son formados por las cisteínas de las posiciones Cys7 con Cys161 y Cys29 con Cys33 (Jelkmann, 1992, Lai, et al; 1986).

Una vez ocurrido lo anterior, la proteína es sometida a un proceso de glicosilación, presentando un patrón de tres N-glicosilaciones en los residuos de asparagina de las posiciones 24, 38 y 83; también tiene una O-glicosilación en la serina con la posición 126. Por tanto, el 40% de la proteína consiste en carbohidratos, el ácido siálico o N-acetilneuramínico destaca en la formación de los oligosacáridos, que también están compuestos por fucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina (Jelkmann, 1992, Lai, et al; 1986).

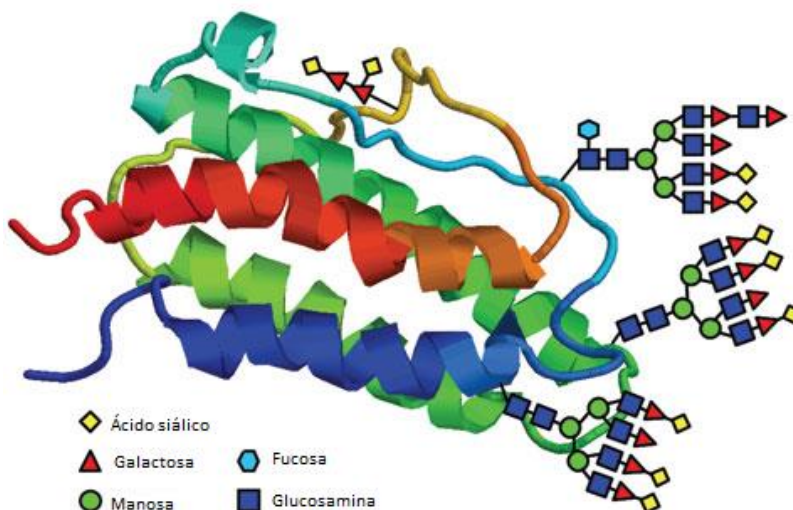


Figura 4. Estructura de eritropoyetina humana (Chemical and Engineering News, 2006)

En la figura 4, se puede observar, que la proteína presenta cuatro α -hélices como estructura secundaria, los puentes disulfuro y la hidrofobicidad que presenta la proteína, le permiten adquirir la estructura terciaria. Además, las glicosilaciones que presenta, le permiten mantener su estructura terciaria, la secreción de la misma y el transporte plasmático. La proteína no glicosilada presenta sólo un 10% de la actividad con respecto a la glicosilada, dado que es eliminada rápidamente de la sangre por el riñón. (Jelkmann, 1992).

2.3.2.1 Receptor de eritropoyetina

El receptor de Eritropoyetina (EpoR) (Figura 5) pertenece a la superfamilia de los receptores de citocinas tipo I (Suzuki, et al; 2015). Es mayoritariamente expresado durante la etapa de inmadurez de la línea progenitora eritroide, en su mayoría en las unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E) y en las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), y va disminuyendo conforme a la maduración eritroide (Lacombe y Mayeux, 1998).

EpoR se expresa como una proteína de 507 aminoácidos y un peso de 66 kDa. Lo conforman tres dominios: uno extracelular, uno transmembranal y otro más intracelular (Pañuela y Gómez, 2010). Los dominios transmembranales son los responsables de la asociación de dos moléculas de EpoR, mientras que los dominios intracelulares se acercan entre ellos después de la unión de una molécula de eritropoyetina (Suzuki, et al; 2015). En el dominio extracelular, existe una secuencia WSXWS (triptófano-serina-X-

triptofano-serina), en donde X es un aminoácido cualquiera, y dos pares de cisteínas, los cuales son marcadores importantes de su pertenencia a la familia de receptores mencionada (Lacombe y Mayeux, 1998).

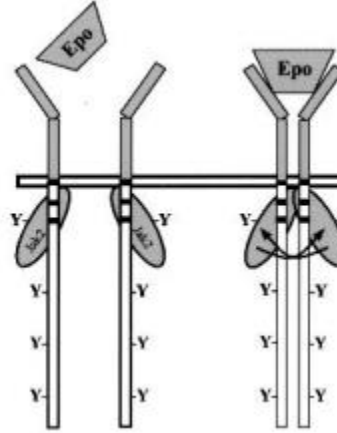


Figura 5. Estructura del receptor de eritropoyetina, se muestra como al unirse la EPO se lleva a cabo la dimerización (Tomada de Fisher, 2003)

Se conocen dos clases de receptores según su afinidad por la eritropoyetina (Jelkmann, 1992), por lo tanto cuando una molécula de eritropoyetina llega al sitio, la cadena con mayor afinidad se une primero (Kd 1nM), y después se une la de menor afinidad (Kd 2µM). Esta unión ocasiona la cascada de señalización que propicia la subsecuente diferenciación y maduración de las células eritroides (Lacombe y Mayeux, 1998, Fisher, 2003). Existe una porción de la proteína en su dominio intracelular que se asocia con la inhibición o regulación negativa del receptor, la cual está constituida de aproximadamente 40 aminoácidos (Youssofian, et al; 1993).

La funcionalidad de la eritropoyetina consiste en ser un factor de crecimiento hematopoyético que toma relevancia en la diferenciación y producción de eritrocitos, a partir de la estimulación de las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E). Este estímulo es captado por las células por medio del receptor específico para eritropoyetina.

2.3.2.2 Mecanismo de acción

La eritropoyetina incrementa la cantidad de precursores eritroides y promueve la liberación de reticulocitos de la médula ósea. Su actividad es realizada principalmente en las CFU-E, en menor proporción en las BFU-E y en la progenie subsecuente, y es nula en las células pluripotenciales primitivas (Ridley, et al; 1994, Alegre, 2005). El proceso de

diferenciación, en el cual participa la eritropoyetina, es conocido como eritropoyesis (Figura 6).

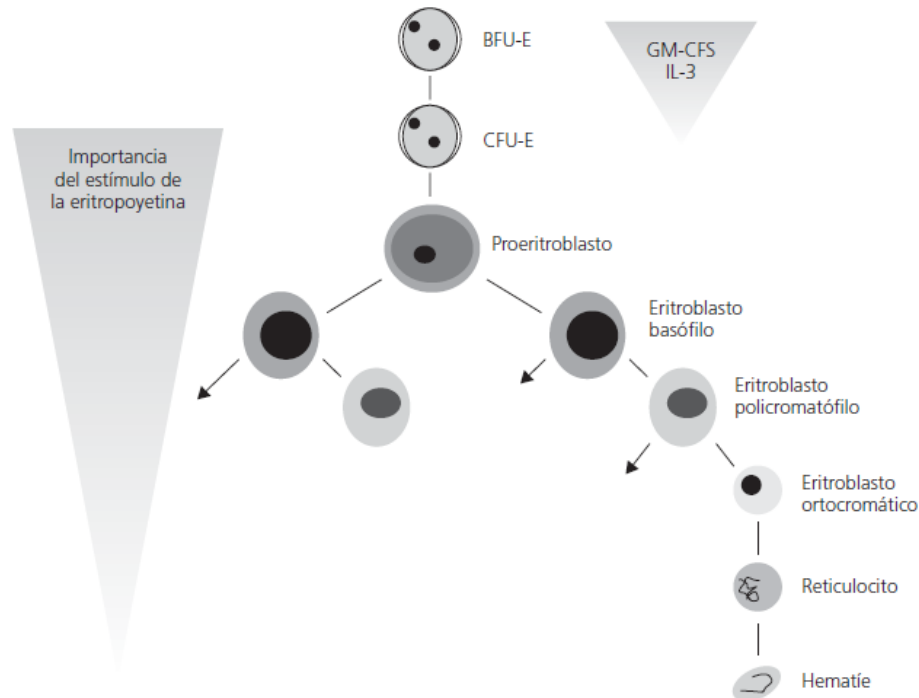


Figura 6. Importancia de la eritropoyetina durante la eritropoyesis (Alegre, 2005)

La llegada de EPO al receptor EpoR, marca el inicio de una vía de señalización que terminará en la proliferación y diferenciación eritroide. Después de la dimerización del receptor EpoR en su dominio transmembranal, el primer paso de la señalización intracelular es la activación de la proteína cinasa JAK2 mediante una transfosforilación (Lacombe y Mayeux, 1998, Suzuki, et al; 2015). La fosforilación de ésta, permite la fosforilación de los residuos de tirosina de la parte citoplasmática del EpoR, estos residuos fosforilados sirven como sitios de acople para varias proteínas de señalización que contienen dominios SH2. Una de estas proteínas es STAT-5 (proteína transductora y activadora de las señales de transcripción), la cual una vez fosforilada se disocia del EpoR y se transloca al núcleo para activar numerosos genes, entre los cuales se pueden encontrar algunos que inhiben la apoptosis. La inhibición de la apoptosis por esta vía es esencial para la diferenciación eritroide, además algunos investigadores la han correlacionado con la proliferación y diferenciación (Peñuela y Gómez, 2010, Jelkmann, 2004, Lacombe y Mayeux, 1998).

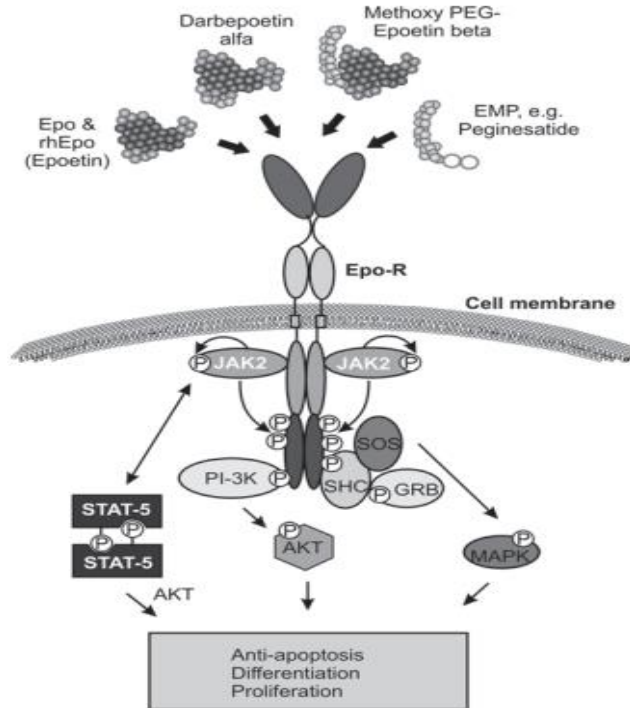


Figura 7. Vías de señalización activadas por la unión de eritropoyetina a su receptor. Vías JAK/STAT, PI-3K y MAPK (Tomada de Jelkmann, W. 2004)

La EPO induce la activación de otros elementos mostrados en la figura 7 que incluyen, la vía Ras/MAP cinasa que está asociado a la inducción de proliferación celular y la fosfatidilinositol cinasa 3 (PI3K/Akt) que promueve la supervivencia eritroide. De esta manera, por medio de la activación de JAK2, el EpoR induce múltiples vías de señalización, todas dirigidas en prevenir la apoptosis e inducir la proliferación y diferenciación terminal de los progenitores eritroides (Lacombe y Mayeux, 1998, Fisher, 2003, Peñuela y Gómez, 2010).

El efecto de la EPO termina por la acción de la fosfatasa hematopoyética celular, la cual cataliza la desfosforilación de JAK2. Después de esto, el complejo EPO-EpoR es internalizado y seguidamente se realiza la desfosforilación del receptor. Esto indica que no existe una reutilización de los receptores y a su vez evita que la proteína se mantenga en circulación pudiendo estimular otros receptores (Jelkmann, 2004).

2.3.3 Agentes estimuladores de la eritropoyesis

Considerando que la anemia se presenta con gran frecuencia en algunos tipos de cáncer así como en la enfermedad renal crónica, se han desarrollado métodos para la obtención de eritropoyetina y otras variantes de la misma, dando lugar a los conocidos agentes estimuladores de la eritropoyesis (Alegre, 2005).

Los agentes estimuladores de la eritropoyesis, se clasifican primordialmente por el tiempo de acción, uno de ellos conocido como de corta duración y el otro de larga duración. En la tabla 3 se presentan los diferentes productos desarrollados (Hörl, 2013), la eritropoyetina delta fue retirada del mercado en el 2009 por la misma compañía que la producía (Cabrera, et al; 2009).

Tabla 3. Agentes estimulantes de la eritropoyesis

Clasificación	Producto	Descripción
Corta duración	Eritropoyetina alfa	Es EPOrh, producida en CHO con un 19% de carbohidratos tetra sialilados.
	Eritropoyetina beta	Es EPOrh, producida en CHO con un 46% de carbohidratos tetra sialilados.
	Eritropoyetina delta	Producida en línea celular humana, retirada del mercado.
	Eritropoyetina omega	Producidas en células de riñón de hámster bebé. Contiene menor cantidad de O-glicanos.
Larga duración	Darbopoetina alfa	Es un análogo de EPO pero en este caso está hiperglicosilado, esto le confiere una vida media más larga.
	CERA (Activador continuo del receptor de eritropoyetina)	La molécula de EPO beta es conjugada covalentemente con un metoxi-polietilenglicol lineal quedando en un peso de 60kDa, lo que aumenta el tiempo de vida media pero disminuye la afinidad por el receptor.

Modificado de Hörl, 2013.

El grupo de productos conocidos como de corta duración, comprende a las eritropoyetinas humanas recombinantes, mientras que los que están comprendidos dentro de la clasificación de larga duración, son modificaciones o análogos de las mismas.

2.3.4 Eritropoyetina humana recombinante

La Eritropoyetina humana recombinante se obtiene a partir de células de ovario de hámster Chino transfectadas con el gen de la eritropoyetina humana. La diferencia entre la EPOrh y la EPO es mínima, siendo ésta en la cantidad de sialilación debida al vector utilizado (Sasaki, et al; 1987, Jelkmann, 2004). En la tabla 3 se muestran las EPOrh's que se han producido a nivel mundial. Las EPOhr's que llevan más tiempo en el mercado y que aún son las que más comúnmente se utilizan son la EPO alfa y beta. Cabe mencionar que la EPOrh lleva aproximadamente 27 años en el mercado (Jelkmann, 2004).

Ambas EPOrh's, son obtenidas de células de ovario de hámster chino, sin embargo, la EPO beta presenta una mayor cantidad de carbohidratos sialilados, siendo un 46% contra un 19% de la EPO alfa. Esta proporción ocasiona que existan diferencias en la cantidad de isoformas presentes en cada uno de los tipos de EPO (Storring, et al; 1998). Hasta el momento no se han reportado diferencias clínicas importantes en cuanto a la seguridad, eficacia y farmacocinética de ambas moléculas (Hörl, W. 2013).

En la tabla 4, se presentan las diferentes EPOrh comercializadas tanto en México como a nivel mundial, entre las que se encuentran los productos innovadores y los biocomparables, algunos de los cuales están en proceso de demostrar dicha biocomparabilidad. En México, el medicamento de referencia, para realizar las pruebas de biocomparabilidad, es el llamado Recormon de Roche para EPO beta. En la actualización realizada en Marzo de 2016 del listado de COFEPRIS, no se presenta ningún medicamento de referencia para EPO alfa (Flores, 2016).

Tabla 4. Medicamentos innovadores y biocomparables conteniendo eritropoyetina humana recombinante

Innovadores de eritropoyetina humana recombinante		
Nombre distintivo	Nombre genérico	Laboratorio productor
Procrit	Eritropoyetina alfa	Ortho Biotech
Epogen		Amgen
Epex / Erypo		Janssen-Cilag
Recormon	Eritropoyetina beta	Roche-Boehringer
NeoRecormon		Roche
Epo omega	Eritropoyetina omega	Baxter
Repotin		Bioclones
Dynepo	Eritropoyetina delta	Shire Pharmaceuticals
Medicamentos Biocomparables conteniendo EPOrh		
Abseamed	Eritropoyetina alfa	Medice Arzneimittel Putter
Binocrit		Sandoz
Epoetin alfa Hexal		Hexal Biotech
Medicamentos conteniendo EPOrh en proceso de demostrar biocomparabilidad		
Erlan	Eritropoyetina alfa	Landsteiner-Scientific
Exetin-A		Pisa
Bioyotin		Probiomed
Epocrym, Epomax		Cryopharma
Yepotin		Teva
EPO rh		Amsa

Modificada de Meza, 2016

A la fecha no existe en México, una guía específica para evaluar la comparabilidad de los productos conteniendo EPOrh's

2.3.4.1 Indicación terapéutica

Las indicaciones terapéuticas para las cuales ha sido aprobada la EPOrh son (Jelkmann, 2013):

- Anemia debida a insuficiencia renal crónica, para casos de pre-diálisis y diálisis
- Anemia en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia
- Anemia asociada a tratamiento con zidovudina en pacientes con VIH
- Cirugía electiva
- Anemia en infantes de pretérmino

El tratamiento para pacientes con falla renal se divide en dos etapas, una fase de corrección (inicio) en la cual la dosis recomendada va de 50-100 UI/kg, tres veces por semana por vía intravenosa o subcutánea. Si han transcurrido 8 semanas y no se corrige la cantidad de Hb, puede aumentarse la dosis en 250 UI/kg. Una vez alcanzada la cantidad de hemoglobina dentro del intervalo de 10-12 g/dL, comienza la segunda fase conocida como de mantenimiento donde la dosis recomendada es de 40 UI/kg. En ambas etapas se recomienda no sobrepasar la dosis de 300 UI/kg por el riesgo a eventos trombóticos e hipertensión (Jabs, et al; 1994, Cabrera, et al; 2009).

Entre los factores que pueden ocasionar la anemia en pacientes con cáncer, es la anemia asociada a enfermedad crónica, la infiltración tumoral de la médula ósea, el déficit nutricional, hemólisis, sangrado o mielosupresión secundarias a la quimio o radioterapia. La dosis recomendada de EPO para estos pacientes es de 150 UI/kg, tres veces a la semana por vía subcutánea y se puede realizar ajustes de dosis sin rebasar 900 UI/kg a la semana. Los ajustes de dosis suelen realizarse cada cuatro semanas, y suele seguir administrándose aún cuatro semanas de suspendida la quimioterapia (Cabrera, et al; 2009).

Hasta el momento existen tres usos de la EPO en pacientes con cáncer: uno es con la intención de aumentar los niveles de Hb, el segundo es para reducir la necesidad de transfusiones y por último para mejorar la calidad de vida de los pacientes con la enfermedad (Jurado, et al; 2007).

2.3.4.2 Reacciones adversas

Las reacciones adversas más comúnmente reportadas, son el aumento en la presión arterial o agravamiento de la hipertensión arterial preexistente, especialmente en pacientes con aumento rápido de hematocrito. El riesgo de padecer un accidente tromboembólico, se ve aumentado en pacientes con cáncer o bajo un programa de autotransfusión. Por lo anterior, este medicamento debe evitarse en pacientes con antecedentes de eventos tromboembólicos, con coronariopatías, arteriopatías periféricas, enfermedades en arterias carótidas o eventos cerebrovasculares de carácter grave, así como, en pacientes con hipertensión no controlada y mujeres embarazadas

Algunas reacciones leves reportadas son el dolor de cabeza, dolor muscular, fatiga y fiebre. Existe una reacción adversa que suele asociarse con la mayoría de los medicamentos de origen proteico, que es la inmunogenicidad. La inmunogenicidad, consiste en la generación de anticuerpos contra la proteína administrada. Existen dos mecanismos para explicar la aparición de estos anticuerpos, una por la respuesta inmune clásica en los seres humanos y ésta corresponde a la creación de anticuerpos de larga duración y son anticuerpos neutralizantes de la molécula que les dio origen, inhibiendo la eficacia del producto (Schellekens, 2003).

El otro mecanismo por el cual suelen generarse anticuerpos para los medicamentos de origen proteico, es por reacción cruzada (pérdida de la tolerancia). Ésta se da para sustancias homólogas a las existentes en el organismo, como el caso de la EPO. El mecanismo mediante el cual el organismo se vuelve intolerante ante estos antígenos y se comienzan a crear anticuerpos para estos, es desconocido. Esta reacción está asociada con tratamientos prolongados, por lo que los antígenos son presentados repetidamente, un factor importante es la vía de administración, siendo de las más inmunogénicas la administración subcutánea y la intramuscular (Schellekens, 2003).

En la mayoría de los casos la presencia de los anticuerpos suele producir la pérdida de eficacia del medicamento. Sin embargo, existe una enfermedad asociada a la presencia de estos anticuerpos conocida como aplasia pura de células rojas (PRCA), la cual se caracteriza por anemia severa, conteo bajo de reticulocitos, ausencia de eritroblastos, no respuesta a EPO y la presencia de anticuerpos anti-EPO (Mckoy, et al; 2008). Se ha reportado que la incidencia de esta enfermedad es baja para las distintas formulaciones presentes en el mercado (Macdougall, et al; 2015)

2.3.5 Farmacocinética

En el caso de la EPO, al ser un fármaco de origen protéico, los mecanismos por los que se llevan a cabo los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación suelen estar mediados por receptores. Así mismo, los parámetros pueden variar según la dosis que se administre y el estado de salud/enfermedad del sujeto al que se le administre. En el caso particular de la EPO, se ha reportado que presenta farmacocinética no lineal en humanos, ya que su depuración disminuye de manera dosis-dependiente (Ramakrishnan, et al; 2004)

En un estudio realizado en 1990 por Salmonson y colaboradores, en sujetos sanos al administrar una dosis de 50 UI/kg de EPO α por vía intravenosa, el volumen de distribución en el estado estacionario (V_d) fue de 76 mL/kg, la depuración (CI) de 12 mL/h/kg y la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de 4.5 h. Por otro lado, al administrar la misma dosis, por vía subcutánea se encontró un valor de t_{max} de 13 h, una biodisponibilidad de 36% y una vida media de eliminación de 25 h. Al presentar una vida media más larga por vía subcutánea podría ser necesario un intervalo de dosificación más prolongado (Salmonson, et al; 1990).

En el mismo año, McMahon evaluó la farmacocinética del producto innovador de EPO α conocido como EPREX en doce voluntarios sanos. Este ensayo se realizó en dos dosis, una de 150 UI/kg y otra de 300 UI/kg administrada por vía intravenosa. En la tabla 5 se muestran los parámetros obtenidos. En ella, se puede observar que los parámetros CI, K_e , $t_{1/2}$ y V_d no se ven afectados al administrar estas dosis, mientras que el área bajo la curva (ABC) se ve duplicada (McMahon, et al; 1990).

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de una administración intravenosa

Parámetro (unidades)	150 UI/kg	300 UI/kg
ABC (UI·h/mL)	25.73 \pm 4.71	55.00 \pm 5.83
CI (mL/h/kg)	6.0 \pm 1.0	5.5 \pm 0.6
K_e (h ⁻¹)	0.131 \pm 0.020	0.114 \pm 0.007
$t_{1/2}$ (h)	5.3	6.1
V_d (mL/kg)	45.7 \pm 4.5	48.6 \pm 7.3

Modificada de McMahon, et al; 1990.

En 1991, Halstenson y colaboradores, publicaron un estudio en el cual se compararon los parámetros farmacocinéticos de dos tipos de EPOrh, eritropoyetina alfa y beta ambas administradas a una dosis de 100 UI/kg. Los resultados se muestran en la tabla 6. En ella se puede observar que la vida media de la EPOrh beta es más larga que la que presenta la EPOrh alfa, siendo los valores de 8.79h y 6.77h respectivamente para una administración intravenosa. En cuanto a la administración subcutánea, el tiempo de vida media se ve extendido para ambos productos, con tendencia a ser más largo para el medicamento con EPOrh beta, sin tener diferencias estadísticamente significativas, así también el tiempo medio de residencia (TMR) presenta dicha tendencia (Halstenson, et al; 1991).

Tabla 6. Comparación de parámetros farmacocinéticos entre medicamentos conteniendo EPOrh alfa y beta en humanos

Parámetro	EPO alfa 100 UI/kg		EPO beta 100 UI/kg	
	Intravenosa	Subcutáneo	Intravenosa	Subcutáneo
ABC (mUI·h/mL)	12498.6 ± 1608.5	3933.2 ± 891.4	12946.8 ± 2415.3	4146.7 ± 988.8
C_{máx} (mUI/mL)		140.8 ± 72.2		130.9 ± 55.2
T_{máx} (h)		15 ± 8		15 ± 7
K_e (h⁻¹)	0.113 ± 0.031	0.046 ± 0.023	0.084 ± 0.022	0.035 ± 0.017
T_{1/2} (h)	6.77 ± 2.71	19.39 ± 10.71	8.79 ± 2.19	24.18 ± 11.16
TMR (h)	7.94 ± 1.02		8.90 ± 1.08	

Modificada de Halstenson, et al; 1990.

2.3.5.1 Evaluación de farmacocinética en animales

El escalamiento interespecies ha sido utilizado para predecir los parámetros farmacocinéticos en humanos basados en los datos en animales. Ésta es una herramienta muy usada en el desarrollo de medicamentos (Woo, et al; 2007). Como se mencionó anteriormente, para las evaluaciones de los medicamentos biotecnológicos, es importante contar con la mayor información tanto fisicoquímica como preclínica posible, siendo importante los estudios de toxicidad o la farmacocinética como un acercamiento a la biocomparabilidad.

En 1996, Bleuel y colaboradores publicaron un artículo en el cual se realizó la farmacocinética en las siguientes especies animales: perros Beagle, ratas Sprague-Dawley y ratones de la cepa NMRI, de ambos sexos. Estudiaron los dos tipos de administración de EPO, tanto intravenosa como subcutánea y las dosis administradas

fueron a perros, 500 UI/kg, a ratas 1000 UI/kg y a ratones 150 UI/kg. Los resultados se presentan en las tablas 7 y 8 (Bleuel, et al; 1996).

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos en diferentes especies animales tras una administración intravenosa

Parámetro (unidades)	Perro Beagle (500 UI/kg)	Rata Sprague-Dawley (1000 UI/kg)	Ratón MNRI (150 UI/kg)
ABC (UI·h /mL)	69.0 ± 8.5	75.4 ± 5.2	2.102
Cl (mL/min/kg)	0.131± 0.009	0.230 ± 0.016	1.189
K _e (h ⁻¹)	0.106 ± 0.004	0.051 ± 0.002	0.0904
T _{1/2} (h)	6.7 ± 0.3	13.8 ± 0.6	7.7

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos en diferentes especies animales tras una administración subcutánea

Parámetro (unidades)	Perro Beagle (500 UI/kg)	Rata Sprague-Dawley (1000 UI/kg)	Ratón MNRI (150 UI/kg)
ABC (UI·h /mL)	62.1 ± 21.6	55.8 ± 2.4	1.435
C _{máx} (mUI/mL)	1260 ± 262	1769 ± 77	71.8
T _{máx} (h)	18.1 ± 2.5	12.0	3.0
Cl/F (mL/min/kg)	0.207 ± 0.031	0.304 ± 0.015	1.742
K _e (h ⁻¹)	0.043 ± 0.006	0.056 ± 0.002	0.0718
T _{1/2} (h)	24.6 ± 7.6	12.6 ± 0.5	9.7

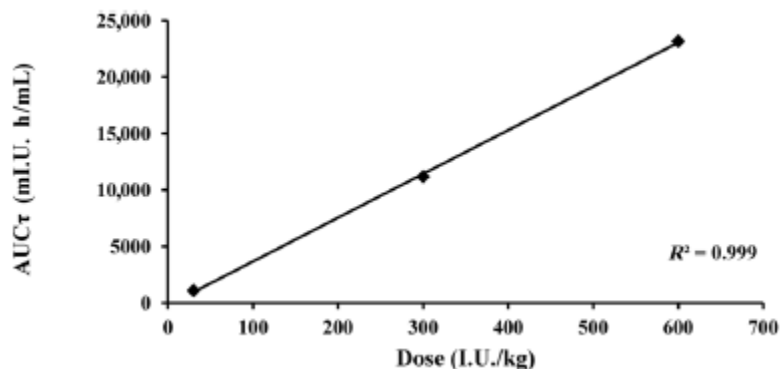
Modificados de Bleuel, et al; 1996

Pucaj y colaboradores, estudiaron la seguridad y biocomparabilidad de un nuevo medicamento conteniendo eritropoyetina. Se administró, la nueva formulación (EPOCIM) a tres diferentes dosis, 30, 300 y 600 UI/kg, y el medicamento de referencia a 600 UI/kg. La vía de administración fue intravenosa. Los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 9. Los resultados de este trabajo mostraron que, a la dosis más alta (600 UI/kg), los parámetros farmacocinéticos, no presentaron diferencias importantes (Pucaj, et al; 2014). En el gráfico 1, se muestra la correlación lineal entre los datos ABC y la dosis administrada para el medicamento EPOCIM en ratas.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de EPOCIM a tres diferentes dosis y el producto de referencia (EPREX a la dosis más alta)

Parámetros (unidades)	EPOCIM (30 UI/kg)	EPOCIM (300UI/kg)	EPOCIM (600 UI/kg)	EPREX (600 UI/kg)
ABC (mUI·h/mL)	1090	11179	23154	27443
Cl (L/h/kg)	0.028	0.027	0.026	0.022
t _{1/2} (h)	4.3	4.2	3.0	4.7
TMR (h)	5.3	3.7	3.6	5.6

Modificada de Pucaj, et al; 2014.



Gráfica 1. Linealidad de dosis con respecto al ABC de EPOCIM en administración intravenosa (Pucaj, K. 2014)

Woo y colaboradores en un trabajo publicado en 2006, evaluaron la farmacocinética de un medicamento conteniendo EPO (Epogen) en ratas Wistar macho a tres niveles de dosis, los cuales fueron 450, 1350 y 4050 UI/kg. Se administraron por vía intravenosa y subcutánea, encontrando que a la dosis más alta, se presentó desviación de la linealidad farmacocinética, siendo el área bajo la curva 12 veces mayor a la obtenida por la dosis de 450 UI/kg. Para la dosis de 1350 UI/kg se conservó la linealidad farmacocinética (Woo, et al; 2006).

2.3.6 Pruebas farmacopeicas para eritropoyetina humana recombinante

Para el caso de los medicamentos biotecnológicos, se han generado algunas monografías para avalar la calidad de los productos. En el caso particular de la eritropoyetina humana recombinante, la Farmacopea Europea y la Farmacopea Mexicana cuentan con una monografía tanto para el biofármaco como para el biomedicamento.

En la tabla 10 se presentan las pruebas que establece la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su undécima edición, tanto para biofármaco como para biomedicamento. En los casos que se indica la comparación con una referencia, se utiliza una solución del estándar del biofármaco.

Tabla 10. Pruebas farmacopeicas para biofármaco y biomedicamento conteniendo EPO

Tipo de evaluación	Prueba	Determinación	Criterio de aceptación
Biofármaco			
Identidad	Electroforesis capilar	Contenido de isoformas 1-8	% de isoforma dependiendo de la misma
	Mapeo de péptidos	Cromatogramas por CLAR	Corresponden los cromatogramas de prueba y referencia
	Análisis de secuencia N-terminal	Comparación de secuencias	Misma secuencia entre prueba y referencia
Pureza	Dímeros y sustancias relacionadas de alto peso molecular	Cromatografía de exclusión molecular	Suma del área de los picos menor a pico principal (2%)
	Ácidos siálicos	Cuantificación por espectrofotómetro	No menos de 10 mol de ácido siálico por mol de EPO
Biomedicamento			
Identidad	Western Blot	Método propuesto y validado por el fabricante	Región identificada en prueba corresponde a la referencia
Pureza	Esterilidad	Filtración por membrana	No crecimiento en el medio de cultivo
	Inocuidad	Administración intraperitoneal a ratones	Ninguno de los ratones muere ni presenta signos de toxicidad en 7 días
Ambos			
Identidad	SDS PAGE	Comparación de bandas en el gel	Misma banda en prueba y referencia
Pureza	Proteínas totales	Determinación de nitrógeno por Kjeldahl	Entre 80 y 120% del especificado por fabricante
	Endotoxinas bacterinas	Utilización de lisado de amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i> o <i>Tachypleus tridentatus</i>	No mayor a 5 UI de endotoxina por 2000 UI de EPO
Potencia	Método en ratones policitémicos	Incorporación de ⁵⁹ Fe en los eritrocitos	Biofármaco: No menos de 100000 UI/mg de proteína Biomedicamento: 80-120% de lo indicado en marbete e IC de 64-156%
	Método en ratones normocitémicos	Cuantificación de reticulocitos en circulación	Biofarmaco: No menos de 100000 UI/mg de proteína Biomedicamento: 80-120% de lo indicado en marbete e intervalo de confianza de 64- 156%

Modificada de FEUM 2014.

2.3.6.1 Evaluación de potencia en animales

Como se establece en la tabla 10, existen dos métodos establecidos en la FEUM para determinar la potencia de los medicamentos que contienen EPO. Uno se realiza en un modelo de ratones policitémicos, para lo cual es necesaria la inducción de policitemia en los ratones. La cepa de ratones hembra sugerida es la conocida como CB6F1, aunque indica que se podría utilizar alguna otra cepa de respuesta adecuada a la hipoxia. Después de inducir la policitemia a los ratones mediante el sometimiento de estos a intervalos de presiones hipobáricas durante un lapso de 14 días, se les administra en dos ocasiones el medicamento a evaluar o la solución del estándar según corresponda con un intervalo de 24 h. Después de este tiempo, se administra cloruro férrico radiactivo. 48 h después los ratones son anestesiados y se les extrae muestras de sangre, para determinar el volumen del paquete de células con ayuda de un instrumento calibrado y la radioactividad en un contador gamma.

Para el método con ratones normocitémicos, se requiere administrar diferentes grupos de ratones hembras B6D2F1 o alguna cepa de respuesta adecuada, soluciones a tres niveles de dosis del medicamento a evaluar y del estándar utilizado. Cuatro días después de la administración, se toman las muestras de sangre, se realiza una tinción con naranja de tiazol y se determina la cantidad de reticulocitos por citometría de flujo.

El segundo método es el de elección, al presentar diversas ventajas entre ellas el no someter a los ratones a estrés, el tiempo de manipulación y el tiempo de duración de la prueba es más corto y el hecho de que no se tiene que utilizar compuestos radioactivos.

Una vez obtenidos los datos del conteo de reticulocitos, para el modelo de ratones normocitémicos, es necesario realizar el análisis estadístico para el cálculo de la potencia, empleando el modelo de líneas paralelas. Este modelo matemático tiene algunos supuestos a ser considerados, tales como:

- La aleatorización de las unidades de prueba (animales de prueba en el caso de EPO).
- La respuesta presenta una distribución normal.
- Los datos son homocedásticos.
- Relación lineal entre el logaritmo de la dosis administrada y la respuesta obtenida.
- Existe paralelismo entre las respuestas de la referencia y de la prueba.

Este último supuesto indica que al realizar una dilución de las dosis a administrar, cada valor de concentración disminuye en igual magnitud al logaritmo del factor de dilución. En este caso, todas las respuestas se verán disminuidas una cantidad constante, es decir, la regresión se desplaza hacia abajo, paralela a sí misma.

Una vez establecida la validez del ensayo, se estima la potencia relativa de la muestra con respecto al estándar. Además, pueden estimarse límites de confianza de la potencia, a partir de cada conjunto de datos del ensayo.

Para la evaluación de la potencia, en el área de investigación, se han utilizado diferentes cepas, además de la cepa CB6F1, las cuales han demostrado ser confiables. Ramos y colaboradores en el 2003, publicaron su trabajo realizado en la cepa CF1, empleando machos y hembras, así como tres metodologías para la determinación de reticulocitos. Las técnicas de cuantificación comparadas fueron la tinción con azul cresol brillante, hemolisis selectiva de eritrocitos y conteo por citometría de flujo, determinando que el método de cuantificación que produce la estimación de potencia más consistente, es el conteo por citometría de flujo. También, llegaron a la conclusión de que el conteo de reticulocitos es más preciso en hembras que en machos con un porcentaje de coeficiente de variación de 13.5% y 20.3% respectivamente. En cuanto al modelo animal utilizado (ratones de la cepa CF1), mostraron que es adecuado para evaluar y comparar formulaciones de EPO (Ramos, et al; 2003, Escobedo-Moratilla, et al; 2015).

Da Silva y colaboradores compararon la respuesta obtenida a diferentes dosis del estándar de EPO_{rh}, en ratones de las cepas Swiss Webster, C57BL/6, NIH y BALB/c, con los obtenidos con la cepa B6D2F1, encontrando que la respuesta obtenida en los ratones Balb/c fue la más parecida a la producida por la cepa de referencia (da Silva, et al; 2013).

Los rangos de dosis evaluados han sido variados, y suelen ir desde 10 UI hasta 270 UI. Lo importante es encontrar el intervalo en donde la respuesta sea lineal al logaritmo de la dosis administrada (Ramos, et al; 2003, da Silva, et al; 2013, Barth, et al; 2008).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Comparar los parámetros farmacocinéticos obtenidos en ratas Wistar de dos medicamentos comerciales conteniendo eritropoyetina humana recombinante y relacionar los datos obtenidos con la potencia relativa entre estos.

3.2 Objetivos particulares

- Obtener la potencia relativa del medicamento de prueba en presentación de 50,000 UI / 10 mL, utilizando como referencia al medicamento Recormon 5,000 UI / 0.3 mL, en dos rangos de dosis empleando el modelo experimental de ratones normocitémicos de la cepa BALB/c.
- Realizar la farmacocinética de los productos comerciales Recormon 5,000 UI / 0.3 mL y el producto de prueba en presentación de 50,000 UI/ 10 mL a dosis de 450 UI/kg en ratas macho Wistar.
- Comparar los parámetros farmacocinéticos, tiempo de vida media, constante de eliminación, tiempo medio de residencia, área bajo la curva desde la administración hasta el último tiempo de muestreo, área bajo la curva desde la administración a infinito y concentración plasmática máxima; obtenidos con ambos medicamentos utilizando la prueba t-student en caso de cumplir criterios para aplicar estadística paramétrica.
- Establecer si existe una posible relación entre la farmacocinética de los medicamentos y la potencia relativa de ambos.

4. Desarrollo experimental

4.1 Reactivos, materiales y equipos

4.1.2 Reactivos

- Ácido fosfórico J. T. Baker.
- Albúmina bovina Sigma Aldrich.
- Cloruro de sodio J. T. Baker.
- Éter etílico J. T. Baker.
- Fosfato dibásico de sodio J. T. Baker.
- Hidróxido de sodio Macrofine chemicals.
- Kit de ELISA para detección de Epo Quantikine IVD.
- Naranja de tiazol BD Retic-Count.
- Solución FACSFlow BD.

4.1.3 Materiales

- Jeringas hipodérmicas para insulina 0.5 mL BD
- Tubos BD Microtainer MAP 500 μ L con EDTA.
- Tubos capilares sin heparina Kimble-Chase
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- Tubos Falcon de 12 x 75 mm.

4.1.4 Equipos e instrumentos

- Agitador vortex para microplacas mixer Techne Bibby scientific limited.
- Agitador vortex MX-S de Science MED Finland Technology.
- Micropipeta Eppendorf de 100-1000 μ L.
- Matraces volumétricos de 100.0 mL, 10.0 mL y 5.0 mL.
- Micropipeta Eppendorf de 20-200 μ L.
- Micropipeta Eppendorf de 500-5000 μ L.
- Micropipeta Pipet-line Rainin de 0.5-10 μ L.
- Balanza Sartorius Practum.
- Balanza Scout PRO OHAUS BS-EA-01.

- Centrífuga Eppendorf 5416.
- Citómetro Cytotflex de Beckham Coulter
- Congelador LAB-LINE a -20°C.
- Lector de microplacas Epoch- Biotek con Software Gen5.
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion Star 211.

4.2 Medicamentos

El medicamento de referencia utilizado fue Recormon® eritropoyetina beta solución de 5,000 UI / 0.3 mL de la marca Roche (Lote: H0645H07 con fecha de caducidad del 1 de Julio de 2017), siendo el medicamento que se encuentra en la relación de medicamentos biotecnológicos de referencia con fecha de actualización del 16 de marzo de 2016. La presentación del producto es seis jeringas precargadas con 0.3 mL del medicamento cada una.

El medicamento de prueba utilizado fue un medicamento conteniendo eritropoyetina humana recombinante solución de 50,000 UI / 10 mL con fecha de caducidad de 29 de Junio de 2016. La presentación del producto es un frasco ampulla con 10 mL del medicamento y un dispositivo para extracción segura.

Ambos medicamentos fueron adquiridos directamente de la farmacia comunitaria y mantenidos en las condiciones indicadas en el marbete conservándose en refrigeración de 2°C – 8°C durante el tiempo de la realización experimental del proyecto, guardándose en su empaque original con la finalidad de protegerlos de la luz.

4.3 Soluciones

4.3.1 Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2N

Se pesaron con precisión 0.8 g de Hidróxido de Sodio en lentejas, se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL y se disolvieron en agua destilada. Se transfirió la solución obtenida a un matraz aforado de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. La concentración de NaOH obtenida en esta solución es de 2N.

4.3.2 Solución de ácido fosfórico (H₃PO₄) al 10%

Se colocaron aproximadamente 5 mL de agua destilada en un matraz aforado de 10.0 mL, se tomó una alícuota de 1 mL de ácido fosfórico concentrado (concentración 85-87%) y se añadió lentamente por la pared del matraz, se disolvió y posteriormente se llevó a la

marca de aforo con agua destilada. La concentración de H_3PO_4 obtenida en esta solución es del 10%.

4.3.3 Solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2

Se pesaron con precisión 1.075 g de fosfato dibásico de Sodio (Na_2HPO_4), 0.760 g de cloruro de sodio (NaCl) y 0.100 g de albúmina bovina. El Na_2HPO_4 y el NaCl se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua destilada. Una vez disueltos, se transfirió la solución a un matraz aforado de 100 mL. Se añadió la albúmina bovina y otros 40 mL de agua destilada, se agitó suavemente para evitar la formación de espuma y se ajustó el pH a 7.2 ± 0.05 con las soluciones de H_3PO_4 al 10% o NaOH 2N según fuera necesario. Se llevó a la marca de aforo con agua destilada. Se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Se verificó el pH antes de su uso.

4.4 Estudio de la potencia relativa de eritropoyetina en ratones Balb/c

Para el estudio se utilizaron 126 ratones BALB/c hembras de siete a ocho semanas de edad y entre 16 a 18 g de peso, obtenidos de los laboratorios ENVIGO RMS recibiendo el certificado de salud y el reporte de monitoreo de salud de los animales correspondientes

El estudio se llevó a cabo en el área 518 la Unidad de Experimentación Animal del conjunto E de la Facultad de Química UNAM. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), con apego a la NOM-062-ZOO-1999 (Anexo 1).

La evaluación de potencia relativa, se realizó a dos rangos de dosis. El primer intervalo de dosis evaluado fue 10 UI, 20 UI y 40 UI, el segundo intervalo fue 40 UI, 80 UI y 160 UI. La finalidad de evaluar estos intervalos, fue encontrar las dosis que permitan obtener datos confiables para el cálculo de potencia por el método de líneas paralelas, el cuál es el indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos undécima edición.

4.4.1 Preparación de soluciones de medicamentos para la determinación de potencia relativa a dosis de 10 UI, 20 UI y 40 UI

4.4.1.1 Preparación de solución del medicamento de referencia

Se colocó el contenido de la jeringa en un tubo Falcon nuevo, se tomó una alícuota de 96 μ L del medicamento y se vertió en un matraz aforado de 10.0 mL. Se llevó a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se agitó y trasvasó a un tubo de vidrio tapándolo con papel parafilm y manteniéndola en frío con geles

refrigerantes hasta su uso. La concentración de EPOrh obtenida en esta solución es de 40 UI / 250 µL. Solución A.

NOTA. Todas las soluciones de medicamento fueron administradas dentro de los primeros 30 minutos de haber sido preparadas.

4.4.1.2 Preparación de solución del medicamento de prueba

Se tomó aproximadamente 1 mL de la ampolleta y se colocó en un tubo Falcon nuevo. Se tomó una alícuota de 320 µL y se vertió en un matraz volumétrico de 10.0 mL, se llevó a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se agitó y trasvasó a un tubo de vidrio tapándolo con papel parafilm y manteniéndolo en frío con geles refrigerantes hasta su uso. La concentración de EPOrh obtenida en esta solución es de 40 UI/ 250 µL. Solución B.

4.4.1.3 Preparación de las soluciones de los medicamentos bajo estudio con concentración de [20 UI / 250 µL] y [10 UI / 250 µL]

Para obtener las dosis de 20 UI y 10 UI se realizaron diluciones seriadas de la solución A para el medicamento de referencia y de la solución B para el medicamento de prueba. En la siguiente tabla se muestra la forma de preparación de las soluciones a ser administradas. Todas fueron llevadas a la marca de aforo con solución diluyente fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se mantuvieron en frío con geles refrigerantes hasta su administración.

Tabla 11. Preparación de las soluciones a administrar de los medicamentos bajo estudio

	Solución	Solución utilizada	Alícuota tomada (mL)	Aforo (mL)	Concentración final
Medicamento de referencia	A.1	A	5.0	10	20 UI / 250 µL
	A.2	A.1	2.5	5	10 UI / 250 µL
Medicamento de prueba	B.1	B	5.0	10	20 UI / 250 µL
	B.2	B.1	2.5	5	10UI / 250 µL

4.4.2 Preparación de soluciones de medicamentos para la determinación de potencia relativa a dosis de 40 UI, 80 UI y 160 UI

4.4.2.1 Preparación de solución del medicamento de referencia

El contenido de dos jeringas del medicamento fue trasvasado a un tubo Falcon nuevo, se tomó una alícuota de 384 μ L del medicamento y se vertió en un matraz aforado de 10.0 mL. Se llevó a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se agitó y trasvasó a un tubo de vidrio tapándolo con papel parafilm y manteniéndola en frío con geles refrigerantes hasta su uso. La concentración de EPOrh obtenida en esta solución es de 160 UI / 250 μ L. Solución C.

4.4.2.2 Preparación de solución del medicamento de prueba

Se extrajo un volumen de 1.5 mL de la ampolleta y se colocó en un tubo Falcon nuevo. Se tomó una alícuota de 1280 μ L y se vertió en un matraz volumétrico de 10.0 mL, se llevó a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se agitó y trasvasó a un tubo de vidrio tapándolo con papel parafilm y manteniéndolo en frío con geles refrigerantes hasta su uso. La concentración de EPOrh obtenida en esta solución es de 160 UI/ 250 μ L. Solución D.

4.4.2.3 Preparación de las soluciones de los medicamentos bajo estudio a concentración de [80 UI / 250 μ L] y [40 UI / 250 μ L]

Para obtener las soluciones de 80 y 40 UI se realizaron diluciones seriadas de las soluciones C y D de los medicamentos de referencia y prueba respectivamente. En la siguiente tabla se muestra como fueron preparadas las soluciones, éstas se llevaron a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2 y se mantuvieron en frío con geles refrigerantes hasta su administración.

Tabla 12. Preparación de las soluciones a administrar de los medicamentos bajo estudio

	Solución	Solución utilizada	Alícuota tomada (mL)	Aforo (mL)	Concentración final
Medicamento de referencia	C.1	C	5.0	10.0	80 UI / 250 μ L
	C.2	C.1	5.0	10.0	40 UI / 250 μ L
Medicamento de prueba	D.1	D	5.0	10.0	80 UI / 250 μ L
	D.2	D.1	5.0	10.0	40UI / 250 μ L

4.4.3 Administración de los medicamentos

Los animales fueron marcados mediante muescas y aleatorizados en siete grupos de nueve animales cada uno. A cada uno de estos grupos se le administró, de manera aleatoria una solución de los medicamentos de referencia y prueba en el intervalo bajo (10, 20 o 40 UI). De igual forma se llevó a cabo otro estudio a dosis altas en siete grupos de nueve animales cada uno, a los cuales, se les administró de manera aleatoria una solución de los medicamentos de referencia y prueba en el intervalo alto de dosis (40, 80 y 160 UI). En las tablas 13 y 14 se muestran las dosis/medicamento con las que fueron administrados cada uno de los grupos.

Se cargaron nueve jeringas hipodérmicas para insulina con 250 μ L de las soluciones preparadas el día de la administración según correspondiera el intervalo de dosis a evaluar. En los apartados 4.5.1 y 4.5.2 se indica cómo fueron preparadas las soluciones. El tiempo transcurrido desde la preparación de la solución hasta su administración no fue mayor a 30 minutos. La dosis 0 UI del grupo control, corresponde a una administración de 250 μ L de la solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2.

Tabla 13. Estudio 1. Dosis de EPOrh por grupo experimental primer intervalo de dosis

Grupo	Dosis / medicamento
1	10 UI Referencia
2	40 UI Prueba
3	0 UI Control
4	10 UI Prueba
5	20 UI Referencia
6	40 UI Referencia
7	20 UI Prueba

Tabla 14. Estudio 2. Dosis de EPOrh por grupo experimental segundo intervalo de dosis

Grupo	Dosis / medicamento
1	80 UI Referencia
2	40 UI Referencia
3	40 UI Prueba
4	160 UI Prueba
5	160 UI Referencia
6	0 UI Control
7	80 UI Prueba

La dosis se administró, por vía subcutánea en el plexo interescapular. Los grupos se administraron de manera secuencial de acuerdo a las tablas 13 y 14. El orden de administración intragrupo fue aleatorizado con una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Una vez administrado el medicamento, los animales fueron reasignados aleatoriamente a diferentes grupos y reunidos en jaulas limpias de tal manera que hubiera por jaula un ratón administrado con cada dosis de cada medicamento y un ratón del grupo control, por lo que se formaron 9 grupos (Grupo A- I, n = 7 por grupo), como se indica en la tablas 15 y 16. Así el Diseño de experimentos que se siguió fue un diseño de bloques al azar.

Tabla 15. Estudio 1. Reasignación de grupos post-administración de medicamentos

Grupos	Ratones que conforman cada grupo	
A-I	1 Ratón 0UI control	
	1 Ratón 10UI medicamento de referencia	1 Ratón 10UI medicamento de prueba
	1 Ratón 20UI medicamento de referencia	1 Ratón 20UI medicamento de prueba
	1 Ratón 40UI medicamento de referencia	1 Ratón 40UI medicamento de prueba

Tabla 16. Estudio 2. Reasignación de grupos post-administración de medicamentos

Grupos	Ratones que conforman cada grupo	
A-I	1 Ratón 0UI control	
	1 Ratón 40UI medicamento de referencia	1 Ratón 40UI medicamento de prueba
	1 Ratón 80UI medicamento de referencia	1 Ratón 80UI medicamento de prueba
	1 Ratón 160UI medicamento de referencia	1 Ratón 160UI medicamento de prueba

96 horas después de la administración del medicamento, se tomaron 100 μ L de sangre por punción del plexo ocular con tubo capilar previa anestesia mediante inhalación de éter etílico. Las muestras se recibieron en tubos microtainer con EDTA como anticoagulante, se taparon y homogeneizaron. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su posterior tinción y cuantificación por citometría de flujo.

Los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂ después de tomada la muestra.

4.4.4 Tinción de muestras con naranja de tiazol

El indicador empleado para evaluar la actividad de la EPOrh fue el conteo de reticulocitos. El RNA que contienen estas células se tiñe con el reactivo naranja de tiazol y puede ser detectado por citometría de flujo. El procedimiento de tinción fue el siguiente:

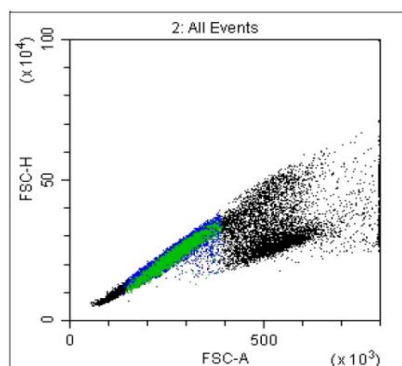
- En un tubo Falcon, se colocó 1 mL del colorante. En el caso de las muestras de autofluorescencia, se adicionó 1 mL de solución FACSFlow (solución amortiguadora con azida de sodio para estabilizar las células) en lugar del colorante.
- Se añadieron 5 μ L de sangre periférica al tubo.
- La sangre y el colorante se mezclaron en vortex.
- Se incubaron por 30 minutos en obscuridad a temperatura ambiente.

Los criterios para realizar la tinción fueron los siguientes: no haber pasado más de 48 h desde la toma de muestra, la sangre total no estaba hemolizada y se mantuvo a temperatura ambiente desde la toma de muestra hasta la cuantificación por citometría de flujo.

4.4.5 Cuantificación y análisis por citometría de flujo

La cuantificación se realizó en la Unidad de Inmunoquímica del Hospital de Especialidades Médicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI dentro de las 3.5 horas después de teñida la muestra. Se utilizó el citómetro Cytoflex de Beckham Coulter con el programa Cytoflex para el análisis de los resultados obtenidos. El láser utilizado fue el de 488 nm y la emisión de fluorescencia fue detectada en la longitud de onda de 530 nm.

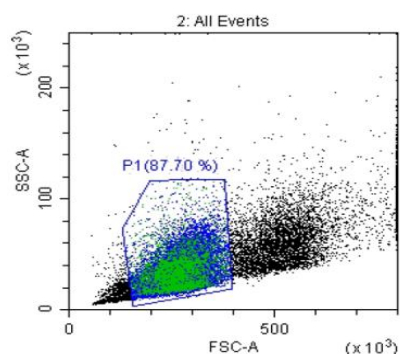
Se adquirieron 50,000 eventos por muestra a flujo bajo, las muestras sin teñir o autofluorescencia se utilizaron para ajustar los parámetros y discernir correctamente cuando la fluorescencia observada se debía al colorante o era la fluorescencia misma de las células.



Gráfica 2. Tamaño altura vs tamaño área

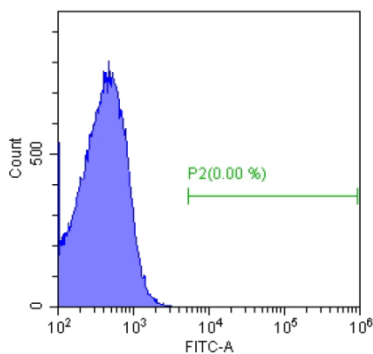
Se crearon gráficas de puntos, como se muestra en la gráfica 2, la cual está en función del tamaño como altura (FSC-H), contra el parámetro de tamaño como área (FSC-A). En la gráfica se puede contemplar la tendencia a crear una línea diagonal. Siguiendo esta línea, se encuentran los eventos sencillos, por lo tanto se hizo una selección de estos eventos para evitar agregados y células muertas o desechos de estas.

Una vez seleccionados los eventos simples, se realizó la segunda gráfica de puntos (Gráfica 3) en la cual se colocó FSC-A contra el parámetro de complejidad (SSC-A). El parámetro de complejidad celular permite distinguir entre células poco complejas (plaquetas, reticulocitos y eritrocitos) de aquellas con mayor complejidad en los organelos (Leucocitos).



Gráfica 3. Tamaño área vs complejidad

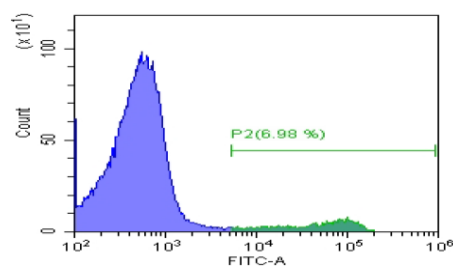
En esta gráfica se seleccionó aquellos eventos que se encontraron en el área de células poco complejas.



Gráfica 4. Histograma biparamétrico de la autofluorescencia (AF)

En la gráfica 5 se puede observar un ejemplo de los histogramas obtenidos para las muestras, donde se presentan los eventos positivos al colorante naranja de tiazol. El ejemplo corresponde a la muestra del ratón 16, al cual se le administró una dosis de 40 UI del medicamento de referencia.

A partir de esta selección se realizó un histograma, en el cual se dividió en eventos positivos a la fluorescencia provocada por el naranja de tiazol (reticulocitos) y aquellos eventos que no captaron el colorante. En la gráfica 4, se muestran las regiones del histograma para una AF, la sección con línea verde es la positiva al colorante.



Gráfica 5. Histograma ratón 16 dosis 40 UI Recormon

El porcentaje mostrado para la población dos, sobre la línea verde es el que corresponde al porcentaje relativo de reticulocitos con respecto a la población seleccionada en la gráfica de puntos SSC-A vs FSC-A.

Una vez realizado el análisis de las gráficas, el programa proporcionó una tabla estadística de las poblaciones seleccionadas, de donde se extrajeron los datos del porcentaje de reticulocitos para cada una de las muestras. Dado que se verificó que las autofluorescencias dieran valores de 0% de reticulocitos, no fue necesario aplicar ninguna corrección a las muestras con naranja de tiazol.

4.4.6 Cálculo de potencia relativa

Para determinar la potencia del producto de prueba, en relación al medicamento de referencia se empleó el porcentaje de reticulocitos obtenido a los diferentes niveles de dosis. Para ello fue necesario asegurar que el ensayo satisface las condiciones del modelo de líneas paralelas.

Las pruebas estadísticas recomendadas para la validez del ensayo son:

- Determinación de datos aberrantes o erráticos: Se utilizaron dos pruebas: intervalo máximo y distancia mínima, la primera de ellas permitió determinar si en algún grupo de dosis/medicamento existía la posibilidad de tener algún valor aberrante, con la segunda prueba se determinó cuál de los datos era el aberrante.
- Cálculo del valor perdido o eliminado: esta prueba sólo se emplea en el caso de tener datos aberrantes con alguna justificación experimental que permitiera la eliminación del dato.
- Prueba de Homocedasticidad de Hartley.
- Prueba de Normalidad de Saphiro-Wilk
- ANOVA para validez del ensayo: Empleada para determinar la linealidad de la respuesta, el paralelismo entre las líneas obtenidas con el medicamento de prueba y el de referencia y la diferencia en la regresión cuadrática, con lo cual se demuestra si las líneas son semejantes.

Para llevar a cabo las pruebas estadísticas de normalidad, homocedasticidad, ANOVA multifactorial y prueba post hoc HSD Tukey se utilizó Statgraphics Centurion XVII empleando un nivel de significancia de 0.05.

Las pruebas para detección de datos aberrantes (intervalo máximo y distancia mínima), el cálculo del valor perdido y el ANOVA de validez del ensayo para el cálculo de potencia por el método de líneas paralelas se realizaron en hojas validadas de Microsoft Office Excel 2013, siguiendo los cálculos indicados en la FEUM undécima edición.

Los datos del porcentaje de reticulocitos deben cumplir con seguir una distribución normal y ser homocedásticos para proceder a realizar el ANOVA para validez de la prueba, en el cuál se debe cumplir con linealidad a la respuesta, paralelismo entre las líneas y no debe ajustarse a una regresión cuadrática para poder utilizar estos datos para el cálculo de potencia relativa.

El cálculo de potencia relativa se realizó siguiendo las ecuaciones planteadas en la FEUM undécima edición.

4.5 Estudio de farmacocinética en ratas Wistar

4.5.1 Preparación de la solución de medicamento de referencia a concentración de 135 UI / 250 μ L

El contenido de una jeringa del medicamento se trasvasó a un tubo Falcon nuevo, se tomó una alícuota de 162 μ L del medicamento y se colocó en un matraz aforado de 5.0 mL. Se llevó a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se agitó y trasvasó a un tubo de vidrio, se cubrió con papel parafilm y se mantuvo en frío con geles refrigerantes hasta su uso.

4.5.2 Preparación de la solución de medicamento de prueba a concentración de 135 UI / 250 μ L

Se extrajo aproximadamente 1 mL de eritropoyetina de la ampollita y se colocó en un tubo Falcon nuevo. Se tomó una alícuota de 540 μ L y se vertió en un matraz volumétrico de 5.0 mL, se llevó a la marca de aforo con solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2, se agitó y trasvasó a un tubo de vidrio tapándolo con papel parafilm y manteniéndolo en frío con geles refrigerantes hasta su uso.

4.5.3 Estudio *in vivo*

El estudio se realizó en el área 518 la Unidad de Experimentación Animal del conjunto E de la Facultad de Química UNAM. El protocolo fue aprobado por el comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL), con apego a la NOM-062-ZOO-1999 (Anexo 2).

Para la evaluación farmacocinética, se emplearon 32 ratas WISTAR machos con un peso de 250-280 g, obtenidos del laboratorio ENVIGO RMS. Los animales fueron entregados con certificado y reporte de monitoreo de salud. Las ratas fueron recibidas una semana antes de iniciar la evaluación farmacocinética con la finalidad de que se adaptaran a las condiciones del bioterio y aumentaran de peso, teniendo un peso al inicio de la evaluación de entre 280-320 g. Los animales para ambos protocolos se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimento y agua *ad libitum*.

El diseño que se utilizó, corresponde a un diseño de dosis única, dos grupos, 1 periodo, paralelo, aleatorizado, la administración de los medicamentos fue aleatoria; los grupos fueron balanceados y contaron con el mismo número de sujetos.

Los animales se dividieron en dos grupos para asegurar el buen manejo de los mismos (periodos experimentales). El tiempo transcurrido entre la administración del grupo uno y el grupo dos fue de una semana. En la tabla 17 se muestra el número de animales a los cuales se les administró el medicamento de referencia y el medicamento de prueba en cada periodo experimental.

La dosis administrada fue de 450 UI / kg y el peso promedio por animal utilizado fue de 300 g, por lo que la dosis administrada fue de 135 UI por animal. Para ello se tomaron 250 µL de las soluciones de prueba y referencia preparadas el mismo día de la administración.

A las ratas control se les administró un volumen de 250 µL de solución diluyente de fosfatos-albúmina-salina pH 7.2. La administración fue por vía subcutánea en el plexo intersecapular de las ratas. Después de la administración, los animales fueron colocados en cajas de poliacarbonato para la posterior toma de muestras.

Tabla 17. Administración de medicamentos para la evaluación farmacocinética

Grupo experimental	Medicamento administrado	Animales administrados
Grupo uno	Referencia	9
	Prueba	6
	Control (Solución diluyente)	1
Grupo dos	Referencia	6
	Prueba	9
	Control (Solución diluyente)	1

4.5.4 Toma de muestras

Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 32 y 48 h después de la administración del medicamento, en el caso de las ratas control se tomaron muestras a las 12, 24 y 48 h.

Se colectaron muestras de 500 µL de sangre en tubos microtainer con EDTA como anticoagulante. La muestra se tomó por punción del plexo ocular previa anestesia por inhalación de éter etílico. La muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos, se separó el plasma el cual se colocó en un tubo eppendorf. Las muestras se guardaron en congelación a -20°C hasta su análisis.

A cada animal se le tomaron diferentes muestras sanguíneas (tabla 18). Dado que el estudio se llevó a cabo por quintuplicado, se emplearon 15 ratas para cada uno de los productos.

Tabla 18. Tiempos de muestreo tomados a las ratas de cada grupo (Se repite para los dos grupos) para conformar los perfiles farmacocinéticos

Ratas	Tiempos de muestreo tomados (h)
1, 2, 3, 4 y 5	0, 1, 2, 4 y 16
6, 7, 8, 9 y 10	8, 12, 32 y 48
11, 12, 13, 14 y 15	4 y 24

4.5.5 Cuantificación de eritropoyetina

El método analítico para la cuantificación de eritropoyetina se llevó a cabo utilizando la técnica conocida en inglés como *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), utilizando los kits comerciales Quantikine IVD comercializados por R&D systems. El kit contiene todos los reactivos necesarios para la cuantificación. El intervalo de la curva de calibración es de 2.5 mUI/mL hasta 200 mUI/mL.

Materiales y reactivos contenidos en el kit Quantikine IVD de R&D systems con fecha de caducidad de Enero de 2017:

- Placa de 96 pozos con primer anticuerpo monoclonal contra eritropoyetina humana recombinante.
- Conjugado de eritropoyetina: anticuerpo policlonal contra eritropoyetina humana recombinante conjugado con peroxidasa.
- Estándar de concentración 0.0 mUI/mL.
- Estándar de concentración 2.5 mUI/mL.
- Estándar de concentración 5.0 mUI/mL.
- Estándar de concentración 20.0 mUI/mL.
- Estándar de concentración 50.0 mUI/mL.
- Estándar de concentración 100.0 mUI/mL.
- Estándar de concentración 200.0 mUI/mL.
- Diluyente de eritropoyetina: buffer con proteína utilizado durante la prueba de ELISA.
- Diluyente para muestras: buffer estabilizador de proteína para realizar diluciones de las muestras plasmáticas.
- Buffer de lavado concentrado: buffer para realizar los lavados de la placa concentrado 25 veces.

- Reactivo de color A: peróxido de hidrógeno 0.01 N en buffer.
- Reactivo de color B: tetrametilbencidina 0.35g/L.
- Solución de paro: ácido sulfúrico 2N.

La metodología a seguir fue la siguiente:

4.5.5.1 Preparación del buffer de lavado

Una vez que la solución concentrada del buffer de lavado llegó a la temperatura ambiente, se agitó suavemente para evitar la presencia cristales de sal. Se midieron 100 mL con una probeta, y se colocaron en un vaso de precipitados de 3L, después se midieron 2400 mL de agua destilada y se mezclaron con la solución concentrada en el contenedor.

4.5.5.2 Preparación de solución sustrato

Se mezclaron en volúmenes iguales el reactivo de color A y el reactivo de color B contenidos en el kit de ELISA. Esta solución se preparó no más de 15 minutos antes de su uso y se mantuvo protegida de la luz.

4.5.5.3 Preparación de puntos control [75 mUI / mL] y [7.5 mUI / mL]

Para el punto control con concentración de 75 mUI / mL se tomaron 225 μ L de la solución del punto de la curva de calibración correspondiente a 100 mUI / mL y 75 μ L de solución diluyente. Se colocaron en un tubo eppendorf y se agitaron en vortex para homogeneizar.

El punto control con concentración de 7.5 mUI / mL se preparó colocando 250 μ L de solución diluyente para muestras en un tubo eppendorf, a la cual se le adicionaron 150 μ L de la solución correspondiente al punto de 20 mUI / mL de la curva de calibración.

4.5.5.4 Análisis de las muestras plasmáticas

Las muestras plasmáticas de los diferentes tiempos, excepto a las 0 y 48 h, se diluyeron empleando el diluyente para muestras contenido en el kit. En la tabla 19 se muestran las diluciones realizadas. Una vez hecha la dilución se empleó la técnica descrita en la figura 8. La absorbancia de cada pozo se determinó a dos longitudes de onda (450 u 600 nm), utilizando el lector de microplacas Epoch-Biotek. Se llevó a cabo una corrección, la cual consistió en restar la absorbancia a 600 nm de la obtenida a 450 nm, esto ayudó a corregir las diferencias en absorbancia ocasionadas por las imperfecciones ópticas en la microplaca de poliestireno, debidas a las diferencias de grosor en cada pozo de la microplaca.

Tabla 19. Dilución de las muestras de plasma

Tiempo de muestreo (h)	Volumen de plasma (μL)	Volumen de diluyente (μL)	Factor de dilución
1	125	125	2
2	125	125	2
4	50	200	5
8	50	200	5
12	50	200	5
16	50	200	5
24	75	225	4
32	125	125	2

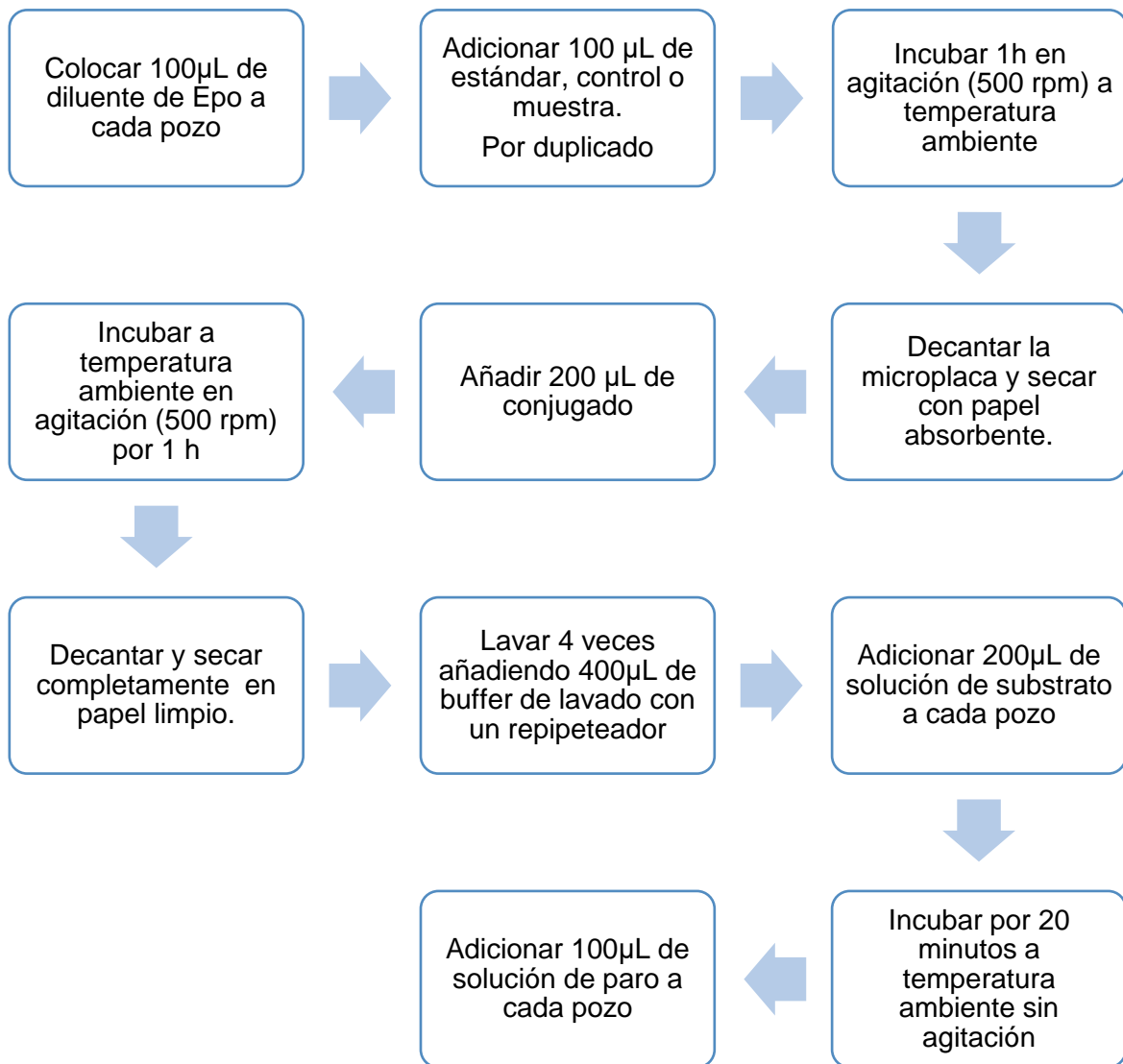


Figura 8. Diagrama del procedimiento para el ensayo de ELISA

Para la curva de calibración, se verificó el modelo al que se ajustaron los datos, utilizando como criterios el valor de r y el porcentaje desviación de la cantidad de EPOrh recuperada en cada punto de la curva. Los criterios a considerar, fueron los indicados en la NOM-177-SSA1-2013: un valor de r >0.99 y un porcentaje desviación menor al 20% para todos los puntos de la curva excepto para el límite de cuantificación, el cual debe ser menor a 25%.

Los puntos control se interpolaron en la curva de calibración y se determinó el porcentaje de desviación utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desviación} = \left| \frac{C \text{ nominal} - C \text{ interpolada}}{C \text{ nominal}} \right| * 100$$

Los puntos control analizados debían tener una desviación menor al 20% para considerar una cuantificación confiable.

4.5.6 Parámetros farmacocinéticos

Los datos de concentración plasmática se analizaron empleando el programa Phoenix WinNonLin 6.4, empleando un modelo no compartimental. Los parámetros que se calcularon fueron: concentración plasmática máxima (C_{máx}), tiempo en el que se alcanzó la concentración plasmática máxima (t_{máx}), área bajo la curva (ABC), depuración/fracción absorbida (Cl/F), tiempo de vida media de eliminación (t_{1/2}) y el tiempo medio de residencia (TMR).

4.6 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas estadísticas para determinar si los parámetros farmacocinéticos seguían una distribución normal y que las varianzas muestrales eran homocedásticas.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los productos, se utilizó la prueba t-student.

Para la realización de estas pruebas se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII empleando un nivel de significancia de 0.05.

5. Resultados y discusión

5.1 Evaluación de potencia relativa a dosis de 10 UI, 20 UI y 40 UI

Primeramente se evaluó la potencia relativa empleando las dosis de 10 UI, 20 UI y 40 UI. Con los datos de porcentaje de reticulocitos para cada tratamiento se realizó la prueba de identificación de datos aberrantes utilizando la prueba estadística indica en la FEUM undécima edición, primero se aplicó la prueba de intervalo máximo con la cual se identificó el grupo donde se tenía un dato aberrante, el dato pertenecía a la administración de 20 UI del medicamento de prueba. La identificación concreta del dato se realizó con la prueba de distancia mínima, también indicada en la FEUM, el valor fue de 3.96%. Después de realizado un análisis retrospectivo de lo sucedido durante el proceso experimental, se decidió eliminar el dato, debido a que una vez realizada la administración al ratón, se drenó un poco de la dosis fuera del sitio de administración. Por lo anterior, se realizó el cálculo de un nuevo valor como se indica en la FEUM para sustituir el dato aberrante para el posterior tratamiento estadístico.

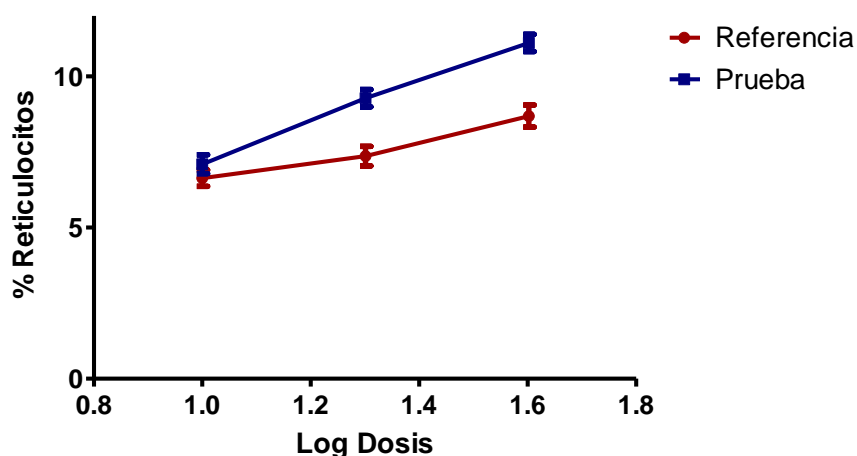
En las tablas 20 y 21 se muestran los valores promedio del porcentaje de reticulocitos en cada uno de los niveles de dosis con su respectivo valor de % de coeficiente de variación. Dado que el %CV fue menor al 20 %, se demostró que la precisión es adecuada. En la gráfica 6, se muestran las líneas producidas con los valores promedio, tanto para el producto de referencia como el de prueba. En ella se puede observar que la respuesta del producto de prueba tiende a ser superior al de referencia en las dosis de 20 UI y 40 UI, más no en la dosis de 10 UI.

Tabla 20. Porcentaje de reticulocitos obtenidos para el medicamento de referencia

Dosis (UI)	0	10	20	40
% Reticulocitos Promedio	5.11	6.63	7.37	8.69
DE	0.95	0.82	0.97	1.09
% CV	18.66	12.36	13.18	12.56

Tabla 21. Porcentaje de reticulocitos obtenidos para el medicamento de prueba

Dosis (UI)	0	10	20	40
% Reticulocitos Promedio	5.11	7.10	9.28	11.11
DE	0.95	0.94	0.86	0.86
% CV	18.66	13.26	9.32	7.73



Gráfica 6. Porcentaje de reitucocitos producido para los dos medicamentos (Promedio de % Reticulocitos ± SEM)

Para comprobar si el factor medicamento tenía un efecto significativo en el porcentaje de reticulocitos se utilizó la prueba ANOVA multifactorial. Los resultados se presentan en la tabla 22. En ella se puede observar que la dosis y el medicamento tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de reticulocitos con un 95 % de confianza. El factor de caja se refiere a la jaula donde estuvieron los ratones las 96 h posteriores a su administración, así como la posición donde fue colocada la jaula, dado que representa el microambiente, este es considerado como una variable de bloque, por lo tanto es importante controlarlo. La dosis es un factor del que ya se esperaba que existiera un efecto significativo en la cantidad de reticulocitos, dado que éste es el fundamento del método de líneas paralelas para el cálculo de potencia relativa. Finalmente, el factor medicamento es el relevante para este estudio e indica que sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre un medicamento y otro.

Tabla 22. ANOVA multifactorial para determinar la significancia del medicamento

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Caja	12.0364	8	1.50455	1.63	0.1444
Dosis	82.9128	2	41.4564	45.01	0.0000
Medicamento	34.5344	1	34.5344	37.49	0.0000
RESIDUAL	38.687	42	0.92112		
TOTAL (CORREGIDO)	168.171	53			

Se realizaron las pruebas de normalidad de Saphiro-Wilk y homocedasticidad de Hartley con el programa estadístico Statgraphics, determinando si los datos siguen una

distribución normal y que la varianza entre grupos dosis/medicamento fue homogénea. En la tabla 23, se muestran los resultados del ANOVA realizado para asegurar la validez del ensayo para el cálculo de potencia. Se encontró que aún cuando la regresión de las curvas no fue de tipo cuadrática y el logaritmo de la dosis presentó un efecto lineal sobre la respuesta, las rectas no cumplieron con el criterio de paralelismo. Por lo tanto no es válida la estimación de potencia a partir de estos datos. Sin embargo, se decidió calcular la potencia relativa e intervalo de confianza (IC) solamente con fines comparativos. El valor de potencia calculado fue de 208% con un intervalo de confianza que va desde 164% hasta 279%.

Tabla 23. ANOVA para determinar la validez del modelo de líneas paralelas en el intervalo de dosis bajas

Fuente de variación	GL	Suma cuadrados	Cuadrado medio	F _{calc}	F _{tab}
Preparaciones	1	34.528	34.528		
Regresión lineal	1	82.871	82.871	109.981	4.085
No paralelismo	1	8.624	8.624	11.445	4.085
Regresión cuadrática	1	0.042	0.042	0.056	4.085
Diferencia en la regresión cuadrática	1	0.675	0.675	0.896	4.085
Error	39	29.386	0.753		

5.2 Evaluación de potencia relativa a dosis de 40 UI, 80 UI y 160 UI

Debido a que no fue posible realizar el cálculo de potencia en el intervalo de dosis bajas, se realizó la misma evaluación empleando un intervalo de dosis mayor. Primeramente se realizaron las pruebas estadísticas de intervalo máximo y distancia mínima para verificar la existencia de datos anómalos, sin encontrar alguno. Ello permitió asegurar que no existía sesgo en los resultados obtenidos ya sea por la práctica experimental o por alguna variable intrasujeto que proporcionara respuestas extremas.

El porcentaje de reticulocitos fue de 7.23%, 8.88% y 11.33 % para el medicamento de referencia, mientras que para el medicamento de prueba, el porcentaje de reticulocitos fue de 9.15%, 10.54% y 11.93% para las dosis de 40, 80, y 160 UI respectivamente. En las tablas 24 y 25 se presentan los datos de desviación estándar y %CV para cada una de las dosis de los dos medicamentos. Dado que el coeficiente de variación fue menor al 20%, se demuestra la precisión del método.

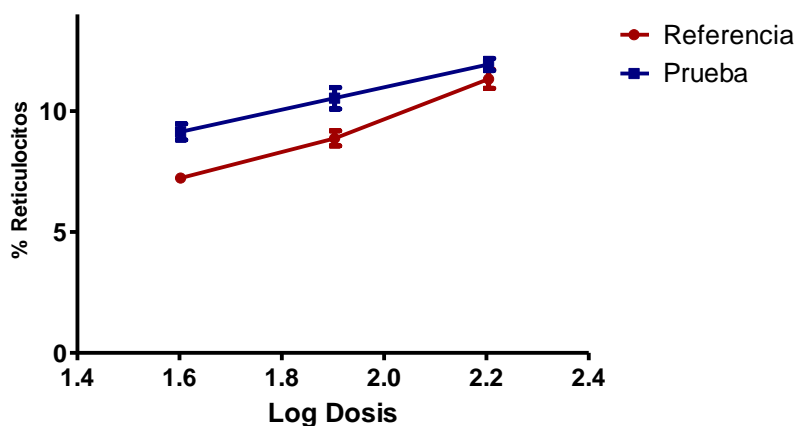
Tabla 24. Porcentaje de reticulocitos obtenidos por el medicamento de referencia

Dosis UI	0	40	80	160
% Reticulocitos promedio	3.64	7.23	8.88	11.33
DE	0.48	0.49	0.93	1.15
%CV	13.23	6.79	10.49	10.18

Tabla 25. Porcentaje de reticulocitos obtenidos por el medicamento de prueba

Dosis UI	0	40	80	160
% Reticulocitos promedio	3.64	9.15	10.54	11.93
DE	0.48	0.99	1.33	0.75
%CV	13.23	10.85	12.60	6.26

En la gráfica 7 se muestran las líneas obtenidas para cada uno de los medicamentos. Se puede observar que el medicamento de prueba produce una respuesta mayor en el porcentaje de reticulocitos con respecto al porcentaje obtenido al producto de referencia. En la tabla 26 se muestra el ANOVA realizado, encontrando que existe una diferencia significativa con un nivel confianza del 95% entre los medicamentos administrados a una $p < 0.05$.



Gráfica 7. Porcentaje de reticulocitos producidos por los dos medicamentos (promedio de % de reticulocitos \pm SEM)

Tabla 26. ANOVA multifactorial para determinar la significancia del medicamento

Factor	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caja	3.46463	8	0.433079	0.39	0.9207
B:Dosis	107.09	2	53.5448	48.02	0.0000
C:Medicamento	26.2504	1	26.2504	23.54	0.0000
RESIDUAL	46.8289	42	1.11497		
TOTAL (CORREGIDO)	183.634	53			

Se procedió a realizar la prueba de normalidad de Saphiro-Wilk y la verificación de homocedasticidad de Hartley para cada uno de los grupos dosis/medicamentos. Los resultados mostraron que la variable se distribuye de manera normal en todos los grupos con varianzas iguales. El ANOVA realizado para asegurar la validez del ensayo, mostró que la respuesta se comporta de manera lineal al logaritmo de la dosis administrada, las rectas entre los medicamentos fueron semejantes y éstas fueron paralelas entre ellas (tabla 27). Por lo anterior, los valores se consideraron confiables para la estimación de potencia relativa e intervalo de confianza para el medicamento de prueba con respecto al medicamento de referencia. El valor obtenido fue de 175% y el intervalo de confianza de 138-233%.

La especificación de la FEUM 11^a edición indica que, la potencia del biomedicamento conteniendo eritropoyetina, se debe encontrar entre 80-120% con un intervalo de confianza de 64-156% en relación a un estándar de referencia. En cuanto a criterios de otras farmacopeas, la Farmacopea Europea y la Farmacopea Brasileña definen un criterio más amplio el cual va de 80-125% mientras que el intervalo de confianza se mantiene igual. Aún cuando no existe especificación para la comparación del medicamento de prueba contra el medicamento de referencia, se considera que el valor es muy alto para poder considerar similitud en la potencia.

En un trabajo anterior realizado por el grupo de trabajo (Meza, 2016), se encontró para este mismo producto, una potencia relativa de 180% y un intervalo de confianza de 137-255%, al utilizar como referencia el medicamento EPREX (EPOrh alfa), que anteriormente se encontraba en la relación de medicamentos biotecnológicos de referencia de la COFEPRIS. Los resultados obtenidos en este estudio corroboran que el medicamento de prueba, presenta una potencia superior a los medicamentos de referencia conteniendo tanto EPO alfa como EPO beta.

Tabla 27. ANOVA para determinar la validez del modelo de líneas paralelas en el intervalo de dosis altas

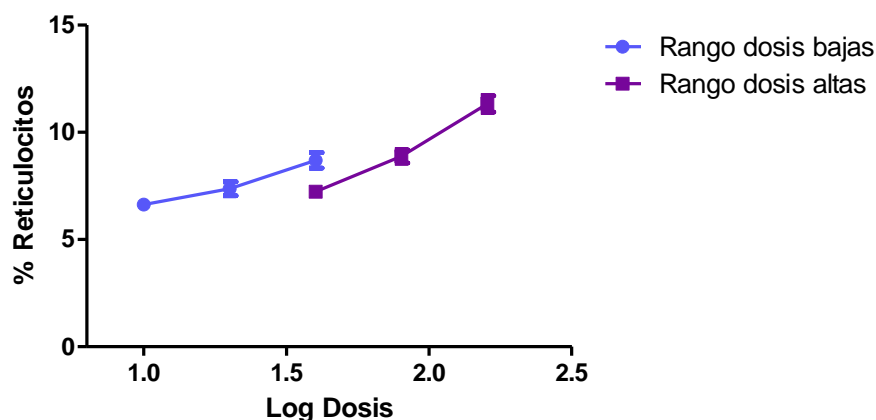
Fuente de variación	GL	Suma cuadrados	Cuadrados medios	F _{calc}	F _{tab}
Preparaciones	1	26.250	26.250		
Regresión lineal	1	106.606	106.606	100.373	4.085
No paralelismo	1	3.861	3.861	3.635	4.085
Regresión cuadrática	1	0.484	0.484	0.456	4.085
Diferencia en la regresión cuadrática	1	0.484	0.484	0.456	4.085
Error	40	42.484	1.062		

En la gráfica 8 se muestran las curvas del medicamento de referencia en los dos rangos de dosis evaluados. Se puede observar que existe una diferencia entre las respuestas obtenidas dependiendo el día en el que fueron administrados. Para corroborar lo anterior, se realizó un ANOVA multifactorial en el que se compararon las respuestas obtenidas para la dosis de 40 UI, que fue la única dosis que compartían ambos días. Los factores incluidos en el ANOVA fueron: la jaula en la que se encontraban los ratones, que es la variable de bloque como se mencionó anteriormente, y los días de administración, encontrando que el día de administración representa una variable con un efecto significativo (tabla 28). Ello demuestra la importancia de realizar la administración de todos los ratones, el mismo día y en la misma sesión.

Tabla 28. ANOVA multifactorial de la variabilidad de la respuesta entre días

Factor	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Caja	7.8571	8	0.982137	2.18	0.1456
B:Día	9.5922	1	9.5922	21.29	0.0017
RESIDUAL	3.6045	8	0.450562		
TOTAL (CORREGIDO)	21.0538	17			

Resultados y Discusión



Gráfica 8. Curvas generadas por el medicamento de referencia en ambos rangos de dosis

Con el fin de determinar si existían diferencias entre la respuesta (porcentaje de reticulocitos) y la dosis administrada, en los dos rangos de concentración estudiados, se realizó un análisis de varianza multifactorial, considerando como factores, la jaula en la que se colocó cada ratón y la dosis administrada dentro del rango; los resultados se presentan en las tablas 29 y 30. En dichas tablas se puede observar que existen diferencias significativas en el factor dosis, tanto para el intervalo de dosis bajas (10, 20 y 40 UI), como para el intervalo de dosis altas (40, 80 y 160 UI).

Tabla 29. ANOVA multifactorial del intervalo de dosis bajas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
B:Caja	9.49627	8	1.18703	1.47	0.2445
A:Dosis	19.542	2	9.77098	12.07	0.0006
RESIDUAL	12.9516	16	0.809474		
TOTAL (CORREGIDO)	41.9898	26			

Tabla 30. ANOVA multifactorial del intervalo de dosis altas

<i>Factor</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Caja	5.38353	8	0.672942	0.76	0.6398
B:Dosis	76.4901	2	38.245	43.32	0.0000
RESIDUAL	14.1253	16	0.882829		
TOTAL (CORREGIDO)	95.9989	26			

Con el fin de conocer, cuales dosis presentaban diferencias estadísticamente significativas, se realizó la prueba post hoc de Tukey. En la tabla 31 se puede observar que no existen diferencias significativas en la respuesta, entre la dosis de 10 UI y 20 UI,

mientras que la dosis de 40 UI fue significativamente distinta con respecto a las otras dos dosis.

Tabla 31. Resultado de la prueba HSD Tukey para dosis bajas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10 - 20		-0.731111	1.09941
10 - 40	*	-2.05556	1.09941
20 - 40	*	-1.32444	1.09941

Los resultados de la prueba post hoc HSD Tukey para el intervalo de dosis altas, se presentan en la tabla 32. En ella se puede observar que existen diferencias significativas en la respuesta entre las tres dosis comparadas.

Tabla 32. Resultado de la prueba HSD Tukey para dosis altas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
40 - 80	*	-1.64667	1.14815
40 - 160	*	-4.09667	1.14815
80 - 160	*	-2.45	1.14815

En un estudio previo, Da Silva y colaboradores, reportaron que la dosis de 10 UI presentó una variabilidad elevada, por lo que, para evaluar la potencia, eligieron las dosis, 30, 90 y 270 UI (da Silva, 2013). Los resultados del presente estudio muestran que no existe paralelismo al emplear la dosis de 10 UI. Estos resultados indican que, sería conveniente revisar de manera profunda que dosis es conveniente administrar para realizar la prueba en el rango lineal de la curva dosis-respuesta, y determinar si las dosis considerada en la FEUM son adecuadas, con el fin de contar con una prueba confiable para llevar a cabo los estudios de potencia de eritropoyetina.

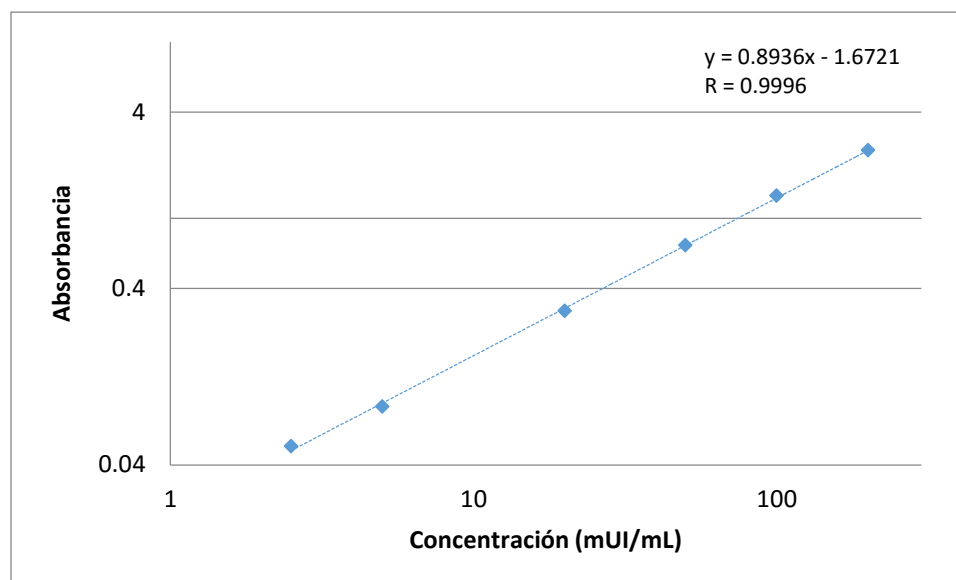
5.3 Estudio de farmacocinética de eritropoyetina

- Método analítico para la cuantificación de EPOhr en plasma

Los datos de respuesta vs concentración se ajustaron a 2 modelos: modelo lineal y al modelo log-log. En la tabla 33 se presentan los resultados obtenidos. En ella se puede observar que el mejor ajuste fue al modelo log-log. La gráfica 9 muestra una curva de calibración típica, empleando este modelo. Los coeficientes de correlación, para las tres curvas de calibración fueron superiores a 0.99.

Tabla 33. Resultados de % Desviación utilizando el modelo lineal y el modelo log-log

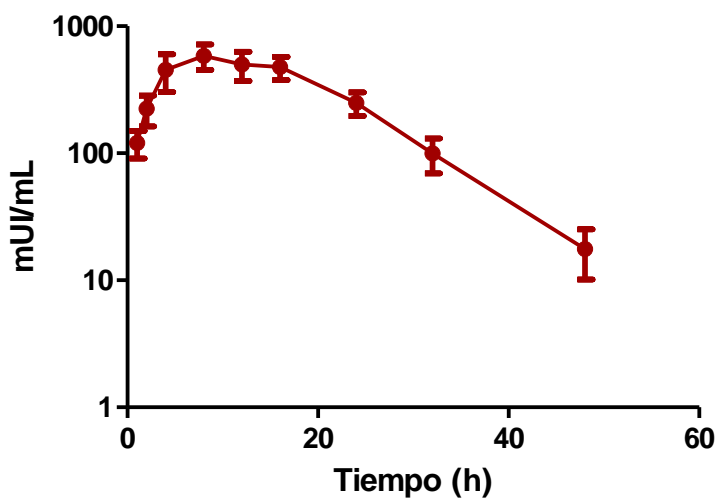
Concentración nominal	Modelo lineal		Modelo log-log	
	Concentración interpolada	%Desviación	Concentración interpolada	%Desviación
2.5	1.5	38.5	2.6	2.5
5.0	4.4	12.3	5.0	0.7
20.0	19.5	2.5	18.9	5.4
50.0	50.8	1.6	49.3	1.4
100.0	103.4	3.4	102.6	2.6
200.0	198.9	0.5	202.8	1.4



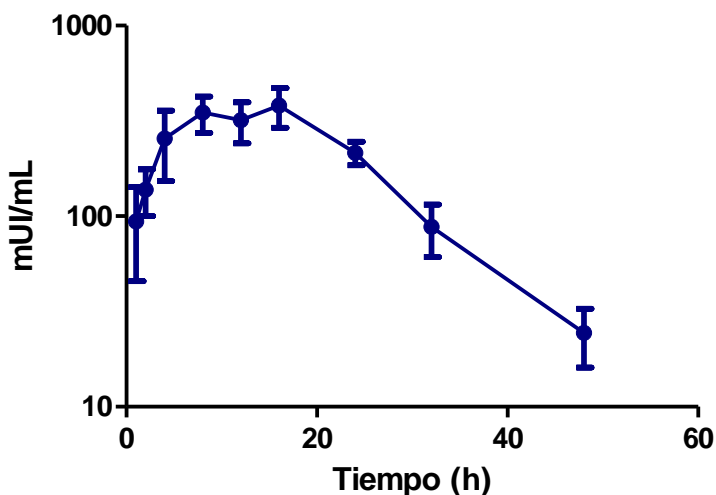
Gráfica 9. Curva de calibración típica obtenida con el modelo log-log

▪ **Parámetros farmacocinéticos**

Para cada uno de los productos, se obtuvieron cinco perfiles farmacocinéticos completos. Las gráficas 10 y 11, muestran los perfiles promedio para el producto de referencia y de prueba, después de la administración de una dosis única de 450 UI/kg. En la gráfica del producto de prueba, se nota una disminución en la concentración en el tiempo de 12h y un aumento a las 16h después de la administración. En la gráfica de la referencia se observó un comportamiento parecido, sin que el aumento de concentración en el tiempo de 16h fuera tan elevado. Ello se puede deber a la variabilidad interindividual de los animales utilizados, dado que las muestras de los tiempos de 8 y 12h fueron tomadas de la misma rata, mientras que la muestra del tiempo 16h se extrajo de una rata diferente.



Gráfica 10. Perfil farmacocinético promedio del producto de referencia (promedio \pm DE) n =5



Gráfica 11. Perfil farmacocinético promedio del producto de prueba (promedio \pm DE) n =5

En la tabla 34 se presentan los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos para el producto de referencia empleando el programa Phoenix WinNonLin. Se puede observar que el tiempo de vida media fue de aproximadamente 6 h, valor muy similar al reportado por Woo tras una administración de 450 UI/kg por vía subcutánea en el que reportan un valor de $t_{1/2}$ de 5.97 h. En la tabla 35 se muestran los parámetros farmacocinéticos para el producto de prueba. El valor de $t_{1/2}$ de este producto fue ligeramente mayor al encontrado en el producto de referencia.

Resultados y Discusión

Al comparar los parámetros farmacocinéticos del producto de referencia, con los reportados en la literatura, por Woo y colaboradores, quienes administraron la misma dosis, se encontró que la $C_{m\acute{a}x}$ fue menor (584 vs 742 mUI/mL), mientras que los valores de t_{max} y Cl/F fueron semejantes (8h como $T_{m\acute{a}x}$ y 37.7 vs 29.01 mL/h/kg).

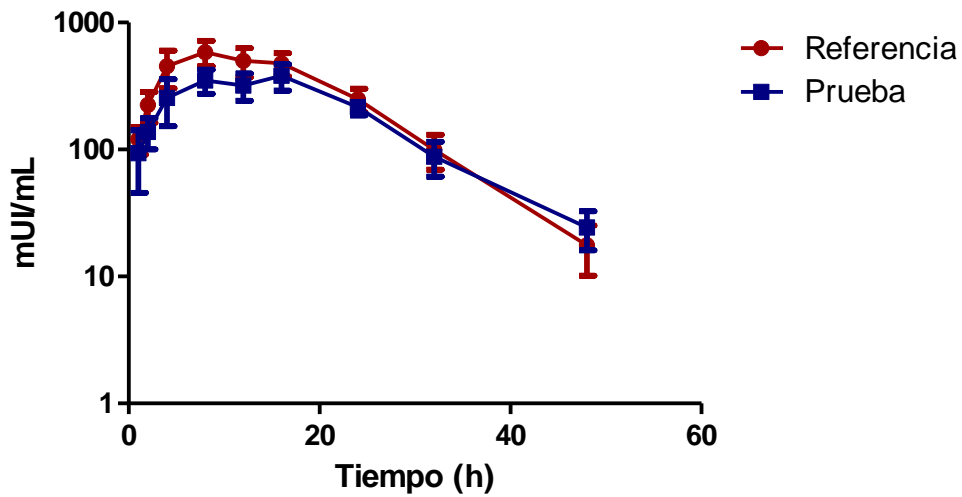
Tabla 34. Parámetros farmacocinéticos del medicamento de referencia

Parámetro	Unidades	Promedio (SD)
$t_{1/2}$	(h)	6.24 (0.54)
k_e	(h ⁻¹)	0.112 (0.010)
$C_{m\acute{a}x}$	(mUI/mL)	584.93 (132.73)
$t_{m\acute{a}x}$	(h)	8 (0)
ABCt	(hmUI/mL)	11771 (3058)
ABCinf	(hmUI/mL)	11934 (3095)
Cl/F	(mL/h)	11.93 (3.02)
Vd/F	(mL)	106.80 (27.23)
TMR	(h)	15.86 (1.49)

Tabla 35. Parámetros farmacocinéticos para el producto de prueba

Parámetro	Unidades	Promedio (SD)
$t_{1/2}$	(h)	7.83 (0.98)
k_e	(h ⁻¹)	0.090 (0.011)
$C_{m\acute{a}x}$	(mUI/mL)	410.68 (62.47)
$t_{m\acute{a}x}$	(h)	10.4 (5.4)
ABCt	(hmUI/mL)	8999 (1326)
ABCinf	(hmUI/mL)	9283 (1447)
Cl/F	(mL/h)	14.80 (2.04)
Vd/F	(mL)	164.66 (16.83)
TMR	(h)	18.43 (0.98)

En la gráfica 12, se muestran los perfiles de ambos productos. En ella se puede observar que la $C_{m\acute{a}x}$ obtenida por el producto de prueba fue menor al de la referencia. Además, el $t_{m\acute{a}x}$ para el producto de prueba esta desplazado, siendo de 10.4h, mientras que para el producto de referencia fue de 8h.



Gráfica 12. Comparación de perfiles entre productos

En la figura 9 se muestran las comparaciones entre los parámetros farmacocinéticos. Los datos obtenidos de cada uno de los perfiles siguen una distribución normal y las vareianzas entre grupos son homocedasticas; por lo que la prueba estadística realizada para determinar la posible diferencia entre los parámetros farmacocinéticos de los medicamentos fue una t-student no pareada. Los parámetros que mostraron diferencias significativas se marcaron con “*” y el valor de p está indicado entre paréntesis.

Resultados y Discusión

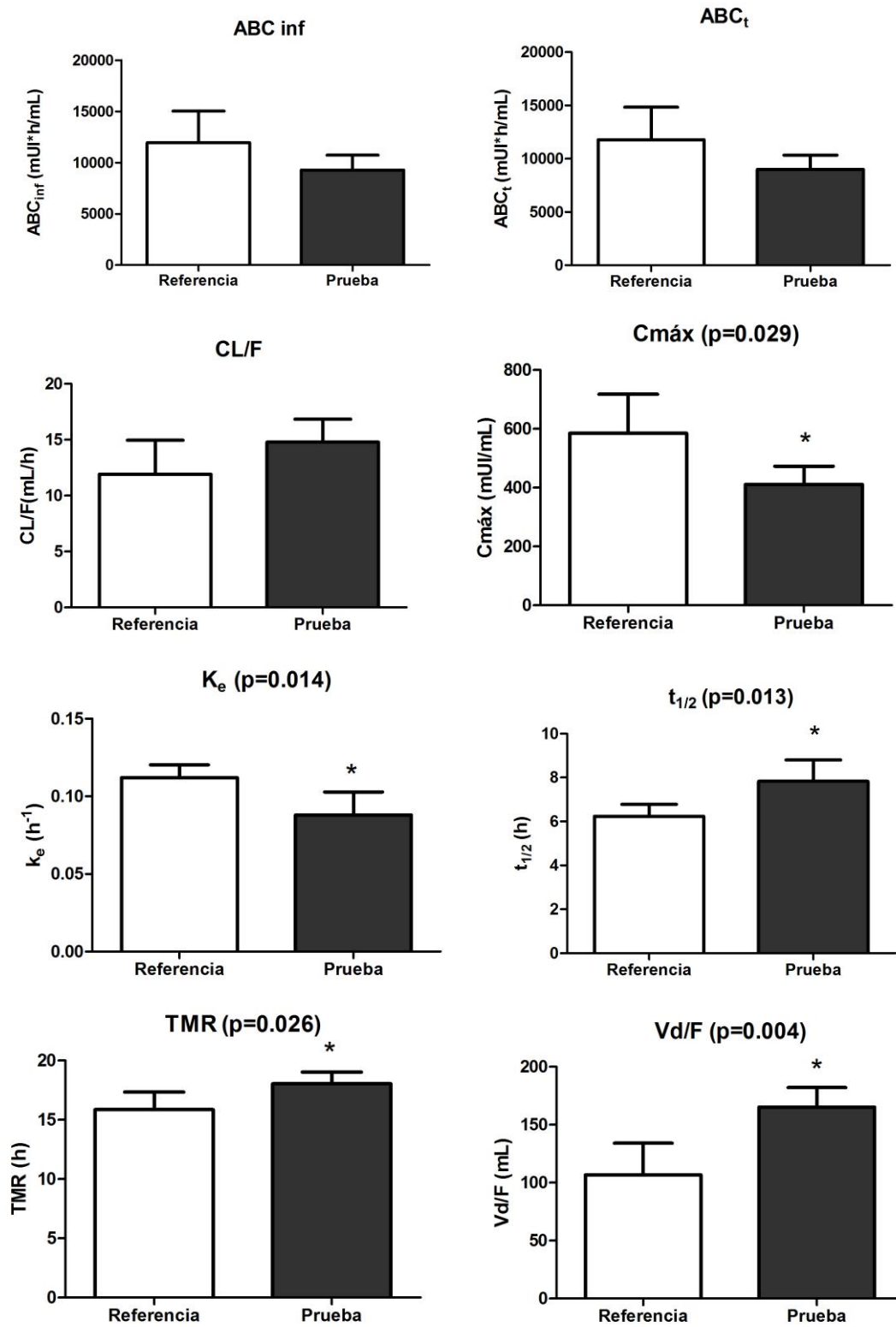


Figura 9. Análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos de los productos bajo estudio

La biodisponibilidad relativa calculada entre los medicamentos fue de 79%, con una tendencia a la baja en el ABC del medicamento de prueba. El parámetro C_{\max} entre ambos medicamentos presentó diferencias significativas, lo cual puede deberse a que el producto de prueba se absorbió de manera más lenta.

El tiempo de vida media del producto de prueba, fue significativamente mayor al de la referencia en aproximadamente 25%, sin embargo, sería necesario cuantificar por un periodo más prolongado para tener un estimado más confiable de la vida media de este producto.

El tiempo medio de residencia, también mostró diferencias para los productos con una $p=0.026$, este factor podría indicar que la molécula de eritropoyetina humana recombinante permanece más tiempo en circulación para el producto de prueba que para el producto de referencia.

El parámetro V_d/F presentó diferencias significativas para ambos productos siendo de 164.66 mL para el producto de prueba y 106.80 mL para el producto de referencia, Halstenson y colaboradores en su trabajo publicado en 1991, encontraron diferencias significativas en el volumen de distribución entre los productos evaluados, después de la administración por vía intravenosa (Halstenson, et al; 1991). En cuanto al parámetro Cl/F no se encontraron diferencias significativas, lo cual puede atribuirse a que el cálculo de dicho parámetro es la combinación de V_d/F y $t_{1/2}$ los cuales tienen diferencias significativas en sentidos contrarios.

5.4 Relación entre farmacocinética y potencia de los productos

Los resultados de potencia mostraron que el producto de prueba, presentó diferencias importantes en cuanto a la potencia relativa tanto con el producto EPREX, como con el Recormon, con valores de 180% (IC de 137-255%) y 175% (IC de 138-233%) respectivamente.

Los parámetros farmacocinéticos que se vieron modificados significativamente, fueron aquellos que se relacionan con el tiempo que se mantiene la eritropoyetina en circulación, lo cual dio lugar a la modificación de la constante de eliminación y en consecuencia en la vida media. Uno de los factores más importantes que determinan la actividad biológica de los agentes estimulantes de la eritropoyesis es el tiempo de duración de la concentración

sérica de la proteína por encima del umbral necesario para la eritropoyesis (MacDougall, 2002).

Las diferencias en potencia y en el tiempo de vida media de productos conteniendo EPOrh podrían estar asociado a cambios en el patrón de glicosilación de la molécula. Las diferencias en el patrón de glicosilación de EPOr en cuanto a carga y tamaño, son conocidas como isoformas y dan lugar a heterogeneidad entre productos (Halstenson, et al; 1991, Storing, et al; 1998).

Uno de los cambios más importantes en el patrón de glicosilación, es la cantidad de ácido siálico que contiene la molécula, a lo cual se le atribuyen cambios en la potencia biológica (Cabrera, 2009, Egrie, et al; 2003). El mecanismo por el que se rompen las moléculas de ácido siálico es llamado desialilación y cuando esto ocurre, deja expuestos los residuos galactosilicos, permitiendo la eliminación hepática mediada por la unión a receptores de galactosa en los hepatocitos (Fukuda, et al; 1989), además la desialilación provoca un aumento en la afinidad en el EpoR (Storing, et al; 1998). La eliminación de EPO no es aún muy clara, pero se ha relacionado a tres mecanismos, siendo el de menor importancia la eliminación renal seguido de la eliminación hepática y el mecanismo más importante de todos es el realizado en las células blanco, al ser internalizado el complejo EPO-EpoR y posteriormente degradado (Jurado, et al; 2007, Woo y Jusko; 2007).

Los resultados obtenidos a la fecha, indican que la diferencia en el tiempo de vida media y el tiempo medio de residencia, pueden estar relacionados con la diferencias de potencia. Al encontrarse la EPOrh del medicamento de prueba durante más tiempo en el organismo, aumenta la probabilidad de que encuentre su sitio blanco (EpoR) y realice su efecto, si ésta se encuentra por encima del umbral de eritropoyesis, viéndose reflejado en un aumento en la cantidad de reticulocitos y como consecuencia una diferencia en la potencia relativa.

Las diferencias encontradas en farmacocinética y potencia relativa podrían indicar que se requiere una mayor caracterización para demostrar la similitud entre el producto de prueba y de referencia.

Es importante resaltar que el estudio fue realizado solamente con un lote del medicamento de prueba y uno del medicamento de referencia. Por lo que sería

Resultados y Discusión

conveniente realizar mayores estudios tanto en lo referente a la caracterización (lo cual no ha sido realizado aun por el grupo de investigación), así como comparar lo obtenido con otros lotes del mismo producto.

6. Conclusiones

La dosis de 10 UI, no permitió un cálculo adecuado de potencia ocasionando desviaciones para el criterio de paralelismo, debido a que no discriminó correctamente entre la dosis y la respuesta.

La potencia relativa del medicamento de prueba en relación al medicamento de referencia fue de 175% con un Intervalo de confianza de 137-255%.

Los parámetros farmacocinéticos que mostraron diferencias significativas entre los productos fueron: $t_{1/2}$, Vd/F y TMR siendo mayores en el producto de prueba, en tanto que $C_{m\acute{a}x}$ también presenta diferencias pero siendo menor al de referencia. La velocidad de absorción del producto de prueba tiende a ser menor, así como la cantidad absorbida.

El tiempo de vida media y el tiempo medio de residencia pueden estar relacionados con la potencia superior presentada el medicamento de prueba, ya que para este caso tienden a ser más alargados que los del medicamento de referencia.

7. Perspectivas

- Realizar la caracterización fisicoquímica completa de los medicamentos de referencia y prueba.
- Estimar la potencia de los productos de prueba y referencia utilizando el estándar de EPOhr.
- Comparar lo obtenido en este lote del producto de prueba, con otros lotes para determinar su comportamiento.

8. Referencias

Alegre, A. (2005) Eritropoyetina en hematología. Editorial Médica Panamericana.

Almeida, A., Castel-Branco, M., Falcao, A. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, 774(2), 215-222.

Amgen, Del laboratorio a la planta de producción, disponible en: <http://www.amgen.es/profesionales/biotecnologia/produccion> consultado el 7 de Marzo de 2016.

Amgen. (2014). *Biologics and biosimilars an overview*.

Barth, T., Oliveira, P. R., D'Avila, F. B., Dalmora, S. L. (2008). Validation of the normocythemic mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, 91(2), 285-291.

Bleuel, H., Hoffmann, R., Kaufmann, B., Neubert, P., Ochlich, P., Schaumann, W. (1996). Kinetics of subcutaneous versus intravenous epoetin-beta in dogs, rats and mice. *Pharmacology*, 52(5), 329-338.

Brinks, V., Hawe, A., Basmeleh, A. H., Joachin-Rodriguez, L., Haselberg, R., Somsen, G., Schellekens, H. (2011). Quality of original and biosimilar epoetin products. *Pharmaceutical Research*, 28(2), 386-393.

Busher JT. Serum Albumin and Globulin. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 101.

Cabrera, L., Ruiz, B., Sancho, A. (2009). Eritropoyetina: revisión de sus indicaciones. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*; 33:3-9.

Daller, J. (2015). Biosimilars: A consideration of the regulations in the United States and European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1-10.

Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A., Lykos, M. A. (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental Hematology*, 31(4), 290-299.

EMA, Definición de medicamento biocomparable según la EMA consultada en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/q_and_a/q_and_a_de_tail_000125.jsp&mid=WC0b01ac0580533e0c el 8 de Marzo de 2016.

EMA, Listado de guías emitidas por la EMA consultadas en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp el 8 de Marzo de 2016.

Escobedo-Moratilla, A., de la Rosa, A., Pérez-Urizar, J. (2015). Modelos preclínicos in vitro e in vivo para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad. *Gaceta Médica de México*, 151, 377-86.

FDA, Guidance for Industry, scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Abril 2015.

FDA, Guidance for industry, bioanalytical method validation. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Draft 2013.

FDA, Questions and answers for erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) labeling changes consultado en: el 15 de Abril de 2016

FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, undécima edición. Secretaría de Salud 2014

Ficha técnica de insulina disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00030> consultada el 1 de Marzo de 2016.

Ficha técnica de paracetamol disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00316#identification> consultada el 1 de Marzo de 2016.

Fisher, J. (2003) Erythropoietin: Physiology Pharmacology Update, 228(1):1-14.

Flores, F. Medicamentos biotecnológicos y su evaluación. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Documents/Farmacovigilancia/MEDICAMENTOS%20BIOTECNOLOGICOS.pdf>, consultado el 14 de Mayo de 2016.

Franco M., Savio E., Medicamentos biotecnológicos: Conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico, Tendencias en medicina, 2008.

Fukuda, M. N., Sasaki, H., Lopez, L., Fukuda, M. (1989). Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood*,73(1), 84-89.

Halstenson, C., Macres, M., Katz, S., Schnieders, J., Watanabe, M., Sobota, J., Abraham, P. (1991). Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. *Clinical Pharmacology y Therapeutics*, 50(6), 702-712.

Hörl, W. (2013) Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: an update to selection for anemia of chronic kidney disease. *Drugs*, (73): 117-130.

Jabs K, Alexander S, McCabe D (1994). Primary results from the U.S. multicenter pediatric recombinant erythropoiein (epo) study. *Journal of the American Society of Nephrology*; 5: 456.

Jelkman, W. (2011) Regulation of erythropoietin production. *Journal of Physiology*, 1251-1258.

Jelkmann, W. (1992) Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiological Reviews*. 72(2): 449-90.

Jelkmann, W. (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Internal Medicine*. 43(8): 649–659.

Jelkmann, W. (2013). Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 40(5), 302-309.

Jurado, J., Torres, E., Olmos, D., Alba, E. (2007) Erythropoietin pharmacology. *Clinical and Translational Oncology*, (9): 715-722.

Lacombe, C., Mayeux, P. (1998) Biology of Erythropoietin. *Hematologica*, (83): 724-32.

Lai, P., Everett, R., Wang, FF., Arakawa, T., Goldwasser, E. (1986) Structural characterization of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*. 261(7): 3116-21.

Lassmann-Vague, V., Raccach, D. (2006). Alternatives routes of insulin delivery. *Diabetes & Metabolism*, (32):513-522.

Ley General de Salud, publicada en el Diario Oficial de la Federación, última reforma 01 de Junio de 2016.

Li, P., Tan, A., Prestidge, C., Nielsen, H., Müllertz, A. (2014). Self-nanoemulsifying drug delivery systemns for oral insulin delivery: *In vitro* and *in vivo* evaluations of enteric coating and drug loading. *International Journal of Pharmaceutics*, (477): 390-398.

Macdougall, I. C. (2002). Optimizing the use of erythropoietic agents—pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(suppl 5), 66-70.

Macdougall, I., Casadevall, N., Locatelli, F., Combe, C., London, G., Di Paolo, S., Stevens, P. (2015). Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the prospective immunogenicity surveillance registry (PRIMS). *Nephrology Dialysis Transplantation*, 30(3), 451-460.

Martos-Rosa, A., Martínez, J., Morales, J. Fayet, A., Acosta, P. (2015) Biosimilares el camino ha comenzado. *Farmacia hospitalaria*, 39(2): 114-117.

McKoy, J., Stonecash, R., Cournoyer, D., Rossert, J., Nissenson, A., Raisch, D., Bennett, C. (2008). Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations. *Transfusion*, 48(8), 1754-1762.

McMahon, F., Vargas, R., Ryan, M., Jain, A., Abels, R., Perry, B., Smith, I. (1990). Pharmacokinetics and effects of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous injections in healthy volunteers. *Blood*, 76(9), 1718-1722.

Meza, M. (2016) Evaluación de Potencia de productos farmacéuticos que contienen eritropoyetina humana recombinante en un modelo *in vivo*. Universidad Nacional Autónoma de México: 1-75.

Mikhail, A., Farouk, M. (2013) Epoetin biosimilars in Europe: Five years on. *Advances in Therapy*, 30(1): 28-40.

Miranda, M. Marco regulatorio de medicamentos biotecnológicos y biocomparables en México, COFEPRIS, disponible en:

<http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/ESTRUCTURA%20DE%20EXPEDIENTES/17%20BIOTEC.pdf> consultado el 8 de Marzo de 2016.

Nascimento, M., Abreu, C., Costa, R., Delgado, W., y Fernandes, I. (2015). Potency evaluation of recombinant human erythropoietin in Brazil: assessment of reproducibility using a practical approach. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(4), 562-568.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de julio de 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de noviembre de 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen estudios de biocomparabilidad, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de septiembre de 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012, Instalación y operación de la Farmacovigilancia, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de enero de 2013.

Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1-2014, En materia de medicamentos biotecnológicos, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 11 de diciembre de 2014.

Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, publicada en el Diario Oficial de la Federación en 1999.

Novales, X., Amato, J. (2014) Sistema linfhemático. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Ozcagli E, Alpertunga B, Tsatsakis A. (2015) Biosimilar drugs and pharmacovigilance. *Pharmaceutica Analytica Acta* 6:416.

Padilla, J. (2015) Análisis comparativo de criterios y requisitos para productos biocomparables conteniendo eritropoyetina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Palomo, I. (2009) Hematología: Fisiología y diagnóstico. Santiago de Chile: Universidad de Talca.

Pañuela, O., Gómez, L. (2010) Eritropoyetina: más allá de la proliferación y maduración eritroide. *Revista de la Facultad de Medicina*, 18(1): 67-76.

Parnham, M. J., Schindler-Horvat, J., & Kozlović, M. (2007). Non-clinical safety studies on biosimilar recombinant human erythropoietin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100(2), 73-83.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-073-SSA1-2014, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de febrero de 2015.

Pucaj, K., Riddle, K., Taylor, S. R., Ledon, N., Bolger, G. T. (2014). Safety and biosimilarity of ior® EPOCIM compared with Eprex® based on toxicologic, pharmacodynamic, and pharmacokinetic studies in the Sprague–Dawley Rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(11), 3432-3441.

Ramakrishnan, R., Cheung, W., Wacholtz, M., Minton, N., Jusko, W. (2004). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 44(9), 991-1002.

Ramos, A., Schmidt, C., Andrade, S., Fronza, M., Rafferty, B., Dalmora, S. (2003). Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(11), 1561-1569.

Reglamento de Insumos para la Salud, (2014) publicada en el Diario Oficial de la Federación, última reforma 14 de Marzo de 2014.

Relación de medicamentos biotecnológicos de referencia. Consultado en: <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Relaci%C3%B3n%20de%20Medicamentos%20Biotecnol%C3%B3gicos%20de%20Referencia.pdf> el 19 de Abril de 2016

Richter, W., Bhansali, S., Morris, M. (2012). Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration. *The AAPS Journal*, 14(3), 559-570.

Ridley, D; Dawkins, F; Perlin, E. (1994) Erythropoietin: a review. *Journal of the National Medical Association*, 86(2): 129-35.

Salmonson, T., Danielson, B., Wikstrom, B. (1990). The pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration to healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 29(6), 709-713.

Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A., Fukuda, M. (1987). Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *Journal of Biological Chemistry*, 262(25), 12059-12076.

Schellekens, H. (2003). Immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 18(7), 1257-1259.

Schellekens, H. (2005). Follow-on biologics: challenges of the “next generation”. *Nephrology Dialysis Transplantation*, (20): 31-36.

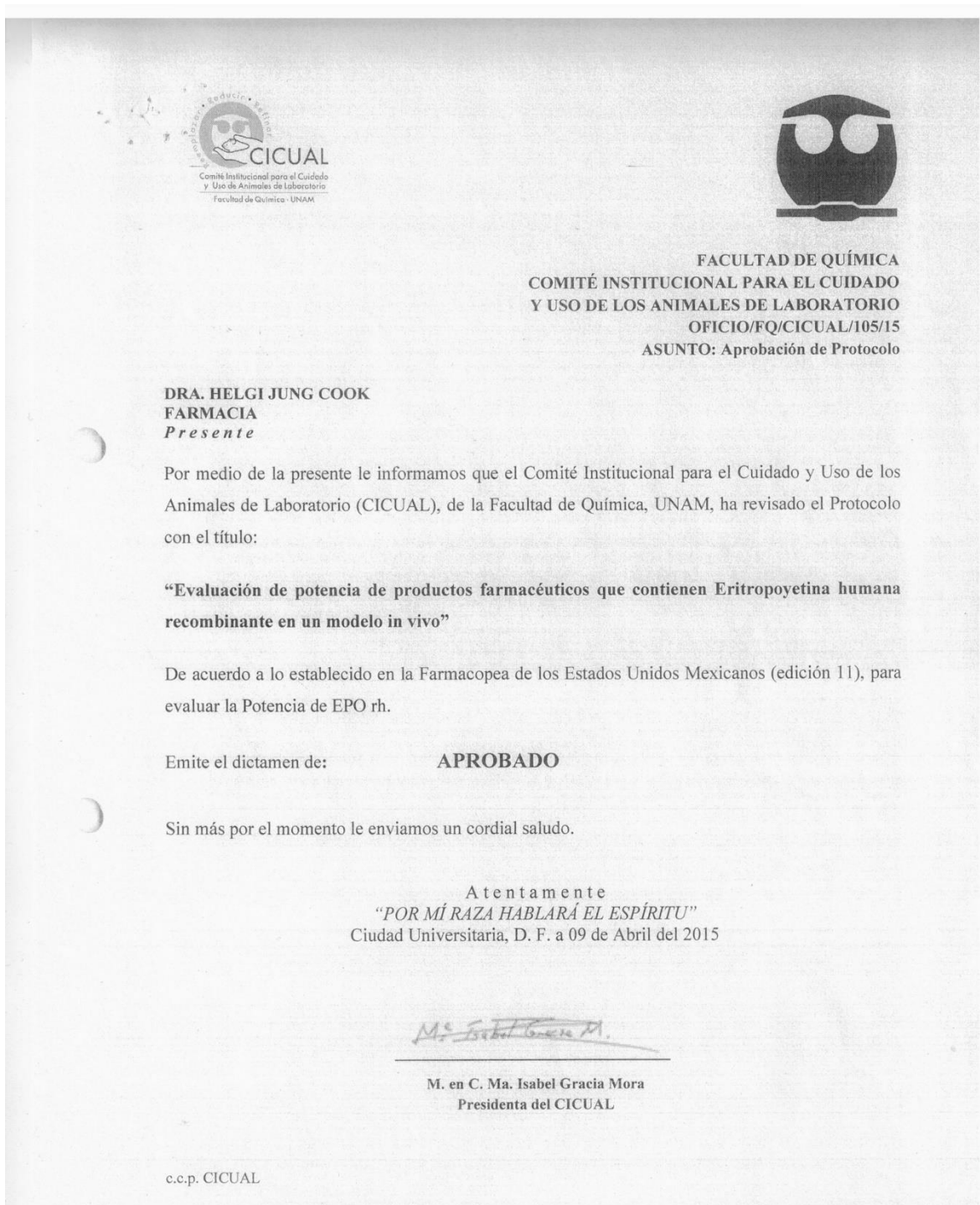
Sekhon, B., Saluja, V. (2011). Biosimilars: an overview. *Dove Press Journal*, (1): 1-11.

- Sherman, R. (2012) Biosimilar Biological Products. FDA, consultado en: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/howdrugsaredevelopedandapproved/approvalapplications/therapeuticbiologicapplications/biosimilars/ucm292463.pdf> el 8 de Marzo de 2016.
- Shore, N., Movassaghi, N., y Hammond, D. (1968). Quantitative estimation of erythropoietin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 149(1), 46-48.
- Silva, I., Mattos, K., Dick, P., Almeida, A., Silva, R., Hokama, D., y Paumgarten, F. (2013). Ensaio de potência da alfaepoetina: Comparação de camundongos Swiss Webster, NIH, C57BL6, BALB/c com o híbrido B6D2F1. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 1(3), 49-58.
- Storring, P., Tiplady, R., Gaies, R., Stenning, B., Lamikanra, A., Rafferty, B., Lee, J. (1998). Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *British Journal of Haematology*, 100, 79-89.
- Sultatos, L. (2007). Routes of drug administration. *Reference Modules in Biomedical Science*, 1-3.
- Suzuki, N., Mukai, H., Yamamoto, M. (2015) *In vivo* regulation of erythropoiesis by chemically inducible dimerization of the erythropoietin receptor intracellular Domain. *Public Library of Science*.
- WHO, Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutics products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. Draft 2016.
- WHO, Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). WHO Expert Committee on Biological Standardization. 2009
- WHO, Guidance on scientific principles for regulatory risk assessment of biotherapeutic products. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Draft. 2014
- Woo, S., Jusko, W. J. (2007). Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(9), 1672-1678.
- Woo, S., Krzyzanski, W., Jusko, W. J. (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after intravenous and subcutaneous administration in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1297-1306.
- Woodcock, J. (2016) Biosimilar implementation: A progress report from FDA. *Food and Drug Administration, CDER*; 1-11.
- Yang, L., Lou, J., Shi, S., Zhang, Q., Sun, X., Zhang, Z., Gong, T. (2013). Development of a pulmonary peptide delivery system using porous nanoparticle-aggregate particles for systemic application. *International Journal of Pharmaceutics*, (451): 104-111.
- Youssofian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A., Harvey, F. (1993) Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*, 81(9):2223-36.

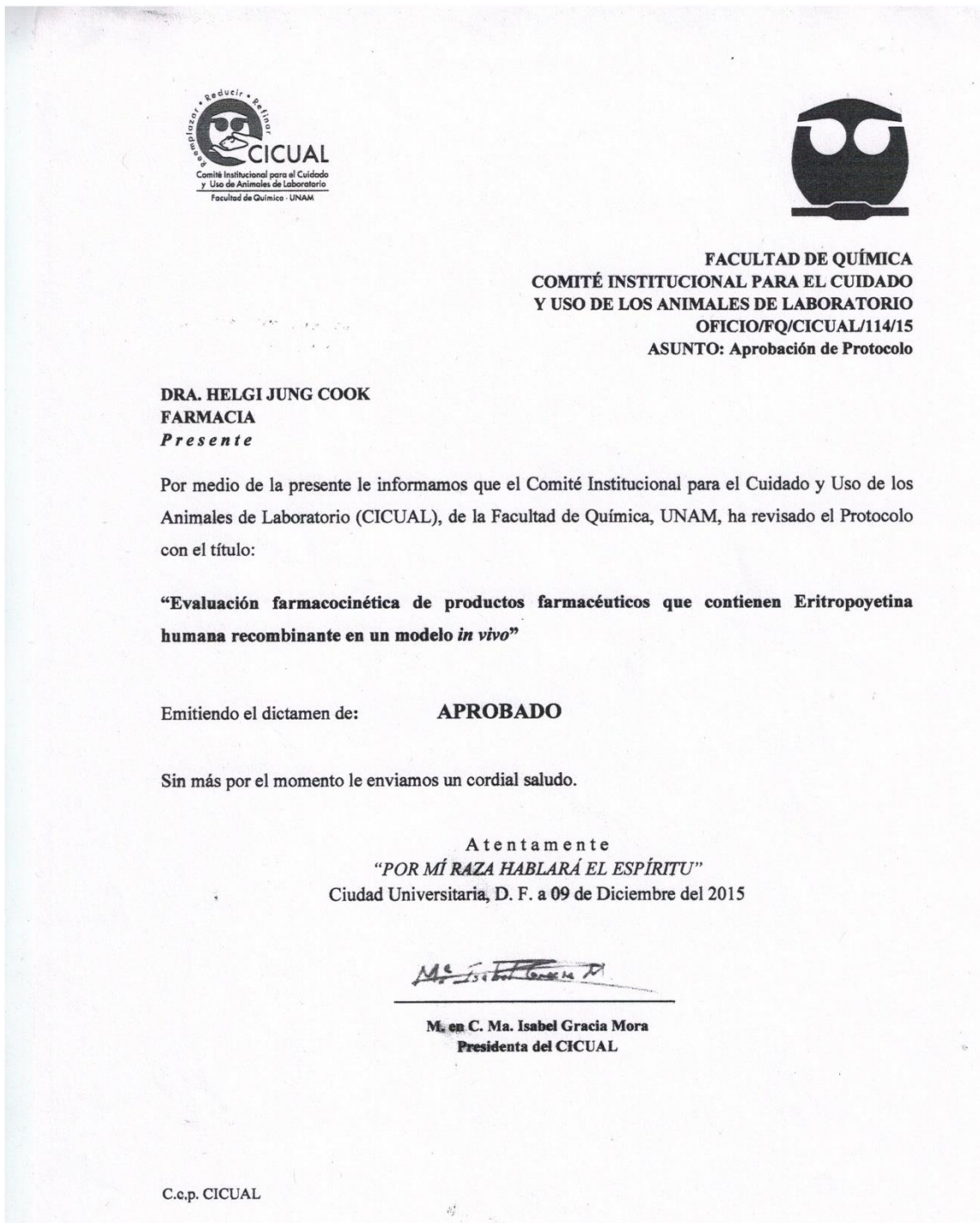
Zhou, H., Xu, Z., Mascelli, M, Davis, H. (2013) Pharmaceutical biotechnology: Monoclonal antibodies and antibody-based biotherapeutics in inflammatory diseases, 4ed, Springer: 393-412.

Anexos

Anexo 1. Carta de aprobación del protocolo para la evaluación de potencia



Anexo 2. Carta de aprobación del protocolo para la evaluación Farmacocinética



Anexo 3. Porcentaje de reticulocitos cuantificado en las muestras de sangre de ratón por citometría de flujo para las pruebas de potencia relativa

Tabla 36. Cuantificación de reticulocitos para el intervalo de dosis de 10 - 40 UI

Dosis	Medicamento	Caja								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
0 UI	Control	4.02	6.29	6.14	5.16	4.14	5.73	5.71	3.72	5.06
10 UI	Referencia	6.27	6.05	6.91	8.19	5.24	7.15	6.55	6.37	6.98
20 UI	Referencia	7.74	7.76	7.92	7.07	7.02	7.48	7.22	5.24	8.84
40 UI	Referencia	8.85	9.95	10.76	8.03	8.60	8.91	8.08	7.44	7.59
10 UI	Prueba	7.60	6.90	6.84	6.16	7.80	6.18	8.65	5.87	7.87
20 UI	Prueba	9.66	10.50	9.84	3.96	7.64	8.69	9.75	8.48	9.65
40 UI	Prueba	12.25	11.76	10.51	11.66	9.48	10.36	11.08	11.64	11.25

Tabla 37. Cuantificación de reticulocitos para el intervalo de dosis de 40-160 UI

Dosis	Medicamento	Caja								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
0 UI	Control	3.37	3.59	4.34	3.25	4.31	4.14	3.25	3.26	3.26
40 UI	Referencia	6.98	7.31	8.02	7.49	6.95	7.45	6.36	6.88	7.63
80 UI	Referencia	9.79	10.13	9.55	7.28	9.29	8.92	7.84	8.72	8.37
160 UI	Referencia	11.34	9.46	10.8	11.71	12.85	12.9	11.23	9.98	11.67
40 UI	Prueba	9.90	7.59	9.86	10.79	8.58	8.12	9.52	9.20	8.75
80 UI	Prueba	12.91	11.08	10.36	9.38	11.01	9.81	12.00	9.33	8.97
160 UI	Prueba	11.22	11.80	11.57	12.99	11.48	11.06	11.75	13.16	12.36

Anexo 4. Parámetros farmacocinéticos para el producto de referencia

	T_{máx}	C_{máx}	ABC_t	ABC_{inf}	ke	t_{1/2}	TMR	V_d/F	CI/F
Perfil	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1	8.00	516.57	9736.38	9814.48	0.12	5.76	15.15	114.36	13.76
2	8.00	564.18	11190.93	11268.44	0.12	5.56	14.49	96.10	11.98
3	8.00	708.98	13734.61	13938.87	0.11	6.59	15.49	92.10	9.69
4	8.00	724.56	15895.36	16136.90	0.10	6.71	15.78	80.96	8.37
5	8.00	410.36	8297.20	8514.47	0.11	6.58	18.38	150.51	15.86
Promedio	8.000	584.929	11770.897	11934.633	0.112	6.240	15.858	106.806	11.928
DE	0.000	132.726	3058.167	3094.851	0.010	0.536	1.489	27.232	3.020
Mínimo	8.00	410.36	8297.20	8514.47	0.10	5.56	14.49	80.96	8.37
Mediana	8.00	564.18	11190.93	11268.44	0.11	6.58	15.49	96.10	11.98
Máximo	8.00	724.56	15895.36	16136.90	0.12	6.71	18.38	150.51	15.86
%CV	0.0	22.7	26.0	25.9	8.9	8.6	9.4	25.5	25.3
Media Geométrica	8.000	572.378	11456.618	11619.496	0.111	6.222	15.805	104.284	11.618

Anexo 5. Parámetros farmacocinéticos del producto de prueba

	T_{máx}	C_{máx}	ABC_t	ABC_{inf}	ke	t_{1/2}	TMR	V_d/F	Cl/F
Perfil	P	P	P	P	P	P	P	P	P
1	16.00	439.04	8957.16	9216.33	0.09	7.50	18.16	158.49	14.65
2	8.00	350.12	7684.91	7910.86	0.09	7.63	18.61	187.95	17.07
3	16.00	501.95	11218.24	11720.63	0.07	9.25	19.16	153.70	11.52
4	4.00	404.22	8492.72	8637.49	0.11	6.59	16.58	148.59	15.63
5	8.00	358.07	8641.73	8929.89	0.08	8.16	17.70	177.92	15.12
Promedio	10.400	410.680	8998.953	9283.040	0.090	7.826	18.043	165.328	14.796
DE	5.367	62.472	1326.421	1446.604	0.011	0.976	0.980	16.825	2.044
Mínimo	4.00	350.12	7684.91	7910.86	0.07	6.59	16.58	148.59	11.52
Mediana	8.00	404.22	8641.73	8929.89	0.09	7.63	18.16	158.49	15.12
Máximo	16.00	501.95	11218.24	11720.63	0.11	9.25	19.16	187.95	17.07
%CV	51.6	15.2	14.7	15.6	12.3	12.5	5.4	10.2	13.8
Media Geométrica	9.190	407.000	8926.400	9200.115	0.089	7.778	18.022	164.657	14.674