

La eritropoyetina humana recombinante como terapia para la neuroprotección en la isquemia cerebral

Iliana Sosa¹, Yuneidys Mengana¹, Jorge D García², Nelvis Subiros², Janette Cruz³, Adriana Muñoz⁴, Y Nuñez⁴, JC García¹

¹Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB
Cuba

²Instituto de Neurología y Neurocirugía, INN

³Centro de Inmunología Molecular, CIM

⁴Centro para el Desarrollo de Medicamentos, CIDEM

E-mail: ccalidad@cenpalab.inf.cu

RESUMEN

Las estrategias terapéuticas actuales para las enfermedades cerebrovasculares se encaminan al restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral y a la protección de las células nerviosas. Se buscan agentes neuroprotectores para el bloqueo de alguno de los eventos moleculares que acontecen en las células nerviosas como consecuencia de la isquemia. Hasta el momento, ninguno de ellos ha satisfecho los criterios de seguridad y eficacia en ensayos clínicos controlados. La eritropoyetina recombinante humana constituye una propuesta reciente, que ha mostrado mecanismos de acción neuroprotectores en más de un nivel, y que parece ser una opción prometedora a corto plazo; aunque su acción eritropoyética puede representar un inconveniente para tratamientos crónicos o en la prevención secundaria. El uso de una eritropoyetina con bajo contenido en ácidos siálicos con actividad neuroprotectora pero no eritropoyética, puede ser una buena opción. Esta molécula debiera administrarse por una vía no sistémica como la vía intranasal, para prevenir su degradación hepática. La administración intranasal de una eritropoyetina recombinante humana con bajo contenido en ácidos siálicos, ha mostrado ser rápida y segura en su acceso al encéfalo, no estimula la eritropoyesis en tratamientos agudos y muestra eficacia terapéutica en varios modelos de isquemia cerebral en roedores. Esta propuesta puede convertirse en una opción terapéutica para la enfermedad cerebrovascular.

Palabras clave: isquemia cerebral, neuroprotección, eritropoyetina, intranasal

Biotecnología Aplicada 2008;25:22-22

ABSTRACT

Recombinant human erythropoietin as a neuroprotective therapy in brain ischemia. Current therapeutic strategies against ischemic cerebral vascular diseases are directed towards both the recovery of cerebral blood flow and the protection of nerve cells. The search of neuroprotective agents has been focused to the blockade of some of the molecular events occurring in the nerve cells after brain ischemia. At the moment, none of them has satisfied the efficacy and safety criteria in controlled clinical trials. Human recombinant erythropoietin has been recently proposed for its use in neuroprotection. It has showed to have more than one mechanism of action, and appears to be a promissory choice in the next future. Its erythropoietic action could be inconvenient for either chronic treatments or in the secondary prevention. Using a low content-sialic acid erythropoietin, without erythropoietic but with neuroprotective activity, could be preferable. Such molecule might be administered through a non systemic route, such as the intranasal via, in order to prevent its hepatic degradation. Intranasal administration of a low content-sialic acid erythropoietin has showed to be safe and rapid reaching the brain, do not stimulate the erythropoiesis after acute treatments and shows efficacy in some rodent models of brain ischemia. This proposal could become into a therapeutic choice in the brain vascular diseases.

Keywords: brain ischemia, neuroprotection, erythropoietin, intranasal

Introducción

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) son la tercera causa de muerte en los países industrializados y en Cuba, donde afectan al 50% de la población mayor de 60 años [1-4]. La mortalidad se incrementa exponencialmente con la edad, y se duplica cada 5 años. Se estiman unos 22 000 casos anuales en Cuba, donde las expectativas de vida ascenderán a 80 años en breve período [3, 4]. Las ECV o ictus están acompañados de un alto costo social e individual por concepto de invalidez y afectación familiar.

Entre estas afecciones, la más preocupante es la enfermedad cerebrovascular isquémica, caracterizada por la disminución, por debajo de un nivel crítico, del flujo sanguíneo cerebral (FSC). A partir de ese evento se originan procesos que inducen los síntomas clínicos de la isquemia cerebral [5].

La orientación terapéutica más importante en los pacientes con ictus isquémico consiste en mejorar el FSC y reducir o bloquear las consecuencias metabólicas subcelulares y celulares [6]. Las estrategias hasta el momento, como la trombolisis, intentan recuperar el FSC, mientras que la neuroprotección busca incrementar la supervivencia celular modificando la cascada isquémica [7, 8].

En Cuba se ha dado atención priorizada a la prevención, con vistas a reducir los índices de morbilidad y mortalidad de las ECV: a los factores de riesgo y a los pacientes que sufren ataques transitorios de isquemia (ATI) [9].

Algunas propuestas recientes van más allá de resolver parcialmente el problema de la cascada isquémica e invocan terapias combinadas y el uso de

1. Anuario Estadístico de Salud en Cuba. [Ref Type: Electronic Citation]. Disponible en: <http://www.infomed.sld.cu/servicios/estadisticas/>; 2003.

2. Hill MD, Hachinski V. Stroke treatment: Time is brain. *Lancet* (1998); 352(3): S1110-4.

3. Lainez JM, Santonja JM. Historia natural de la enfermedad vascular cerebral. En: JR Prous, ed. *Manual de enfermedades vasculares cerebrales* (1999):55.

4. Miranda QJA. *Enfermedades cerebrovasculares*. Editorial Oriente, Santiago de Cuba; 2004.

moléculas propias de la neuroprotección endógena [10-13]. Un buen candidato de este tipo podría ser la eritropoyetina humana recombinante (rHu-EPO), que se ha empleado en el tratamiento de la anemia por insuficiencia renal y en pacientes con cáncer que padecen anemia por quimioterapia y radioterapia. Desde la última década se investiga el efecto de la rHu-EPO en la protección de las células cerebrales frente al daño isquémico [14-16].

A partir de los resultados más recientes sobre la isquemia cerebral, este artículo argumenta la posibilidad de utilizar la rHu-EPO con bajo contenido de ácidos siálicos como un neuroprotector para la isquemia cerebral, así como los beneficios de administrarla por vía intranasal.

Aspectos de la fisiopatología y la terapéutica de la isquemia cerebral

La interrupción o disminución del FSC en un territorio vascular determinado afecta la disponibilidad de oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo energético, que incapacita a las células a mantener su potencial de membrana en reposo, y a las neuronas a conservar sus propiedades de membrana eléctricamente excitable [5]. En la medida en que las condiciones de isquemia prevalecen, las consecuencias moleculares son más drásticas: liberación indiscriminada de neurotransmisores, entrada de iones de calcio y de sodio al citoplasma, edema celular y vascular, así como activación de hidrolasas lisosomales que conducen a la muerte celular aguda en el foco de la isquemia, caracterizado por necrosis tisular [17, 18]. Esta área de infarto se encuentra circundada por una región de penumbra isquémica, que permanece viable durante un tiempo, en dependencia de la eficacia de la circulación colateral [4, 5]. Sin embargo, este flujo residual es insuficiente para el mantenimiento de la función celular.

En zonas de penumbra isquémica, y en mayor medida después de la reperusión, tiene lugar una falla mitocondrial que agrava la insuficiencia energética, el incremento de las formas reactivas del oxígeno que conduce al estrés oxidativo, el daño microvascular que impide la normalización del flujo sanguíneo cerebral y la expresión selectiva de genes que pueden incrementar la supervivencia celular o conducir a la muerte [3, 19]. La expresión genética selectiva comprende la expresión de genes de respuesta inmediata que codifican para factores de transcripción, proteínas de estrés como las proteínas de choque térmico, neurotrofinas y factores de crecimiento, así como las proteínas efectoras del programa de apoptosis (Figura 1) [5, 20]. La apoptosis está considerada como la forma de muerte predominante en la etapa crónica de la isquemia cerebral [21]. La identificación de las facetas características de la apoptosis después de la isquemia ha estimulado numerosas investigaciones dirigidas a la búsqueda de agentes terapéuticos con propiedades antiapoptóticas [22].

La normalización del FSC promueve una recuperación completa solo cuando tiene lugar en las primeras tres a seis horas, en que tiene lugar un ataque transitorio de isquemia (ATI), usualmente debido a la trombolisis espontánea [10, 23]. Un ATI es indicativo de una alteración vascular, que usualmente refleja el establecimiento de condiciones en el sujeto para la ocurrencia

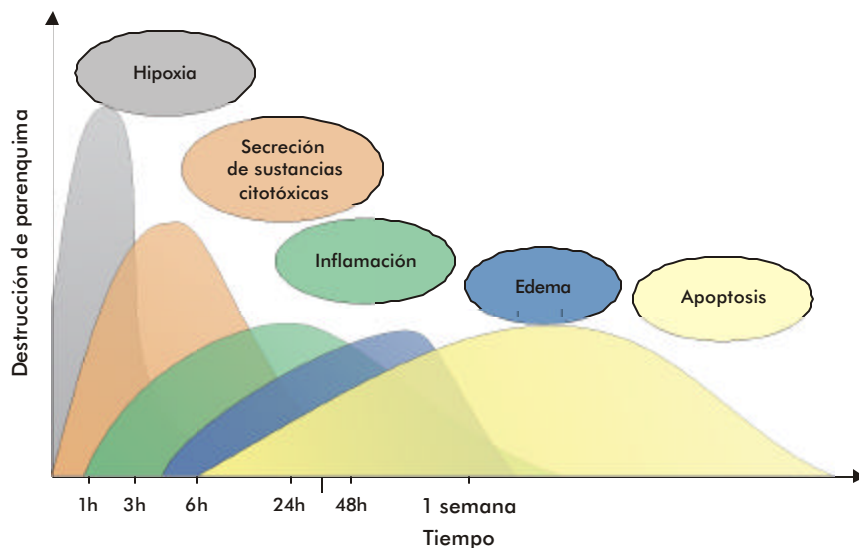


Figura 1. Esquema de la cascada isquémica.

de un accidente isquémico más grave en el futuro. Por lo tanto, los ATI constituyen el foco de atención por excelencia en la llamada *prevención secundaria* [21, 24].

En animales se ha demostrado que la reperusión temprana es capaz de inducir un incremento de la capacidad de respuesta celular contra insultos isquémicos posteriores, fenómeno que se ha denominado *tolerancia a la isquemia*. De no ser así, la cascada isquémica puede ser imparable e incluso potenciada por la reperusión, que por sí misma es responsable de otros daños [20, 25].

El tiempo que media entre el establecimiento de los síntomas y la intervención clínica en un paciente con isquemia conduce al concepto de *ventana terapéutica*, un período variable durante el cual la restitución del FSC y la inhibición de los mediadores de daño celular isquémico evitarían la muerte de las células en riesgo, mientras que si este se sobrepasa, cualquier medida terapéutica resultará inútil [10, 17]. En la práctica, la ventana terapéutica es un factor crítico que determina la eficacia de la neuroprotección. La más aceptada actualmente se considera hasta las 12 horas. No obstante, algunas experiencias demuestran que la viabilidad de parte del tejido cerebral en penumbra isquémica puede extenderse más allá de 48 a 72 horas [22, 25-27].

La rHu-EPO como neuroprotector

Hasta hoy no existe una droga que sea lo suficientemente efectiva, específica y de seguro acceso al sistema nervioso central (SNC), para ser usada como neuroprotector en enfermedades neurológicas en etapa crónica o aguda. Además, la mayoría de los agentes terapéuticos neuroprotectores efectivos en biomodelos de isquemia fallan por no ser tolerados clínicamente [17, 28]. Una estrategia para encontrar una solución a esta dificultad puede ser utilizar las mismas moléculas que se expresan en el cerebro ante diferentes lesiones [11, 29] y que conducen al mantenimiento de la homeostasis. Una de estas moléculas es la eritropoyetina.

5. Guevara GM, Rodríguez R, Álvarez LA, Riaño MA, Rodríguez P. Mecanismos celulares y moleculares de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Rev Cubana Med* (2004); 43(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232004000400008&lng=es&nrm=iso

6. Rodríguez ML, Galvizo SR, Álvarez GE. Neuromodulación farmacológica en la enfermedad cerebrovascular. *Temas actualizados. Rev Cubana Med* (2002); 41:34-9.

7. Kriegelstein J, Klump S. Pharmacology of cerebral ischemia. *Rev Mex* (2002); 3(3):179.

8. Hacke W. Neuroprotective strategies for early intervention in acute ischemic stroke. *Cerebrovascular disease* (1997); Suppl 4.

9. Buergo Zuaznabar MA, Fernández-Concepción O, Pérez Nellar J, Pando Cabrera A. Guías de práctica clínica para las enfermedades cerebrovasculares. *Medisur* (2007) (Número Especial): 1-25. Disponible en: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/246/730>

10. García Salman JD. Protección neuronal endógena: un enfoque alternativo. *Rev Neurol* (2004); 38:150-5.

11. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* (2003); 26:248-54.

12. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* (2003); 198:971-5.

13. Weiss MJ. New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *Oncologist* (2003); 8(3):18-29.

14. Sakanaka M, Wen T-C, Matsuda S, Seiji Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci PNAS* (1998); 95:4635-40.

La eritropoyetina es una glicoproteína que se produce fundamentalmente en el riñón y está involucrada en la proliferación, diferenciación y maduración de los eritrocitos y otras células hematopoyéticas, y aumenta el suministro de oxígeno a los tejidos [30-32]. La eritropoyetina humana recombinante (rHu-EPO) es uno de los diez productos más vendidos por la biotecnología mundial. El hecho de que la eritropoyetina se expresa en el cerebro y es regulada por el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) [11, 33], el cual se activa por una amplia variedad de estresores, ha estimulado el desarrollo de estudios del efecto neuroprotector de la rHu-EPO en diferentes modelos en varios estudios *in vitro* y en diferentes modelos de infarto cerebral (Tabla 1) [33-37].

Se ha comprobado que esta glicoproteína y su receptor (r-EPO) se expresan en el tejido cerebral, y que esta expresión aumenta durante la isquemia, lo cual sugiere su participación en un sistema neuroprotector endógeno en el cerebro de mamíferos [38-40]. La efectividad de la rHu-EPO como neuroprotector se ha probado en modelos de daño del sistema nervioso en ratón, rata, gerbo y conejo, incluyendo en la isquemia cerebral focal y global [41-44], en que ha reducido la muerte neuronal.

Aunque todavía se investiga el mecanismo neuroprotector de la rHu-EPO, se plantea que su acción está mediada por receptores que se encuentran en las paredes del endotelio vascular y en los astrocitos [41, 45]. Los mecanismos de la rHu-EPO como agente neuroprotector parecen ser multifactoriales. La rHu-EPO puede mediar indirectamente la neuroprotección sobre el restablecimiento del suministro de sangre al tejido dañado o actuar directamente sobre las neuronas por activación de numerosas vías de señalización molecular.

La molécula de rHu-EPO aumenta la expresión de enzimas antioxidantes y reduce la formación de radicales libres mediada por el óxido nítrico, mediante un mecanismo que involucra la JAK2 y el factor nuclear NF-κB [30, 46]. Su acción antioxidante también se sustenta en el restablecimiento de las actividades de la catalasa citosólica y la glutatión peroxidasa en eritrocitos, lo cual protege contra el estrés oxidativo por la reducción de la peroxidación lipídica [47].

Se ha demostrado que la rHu-EPO también tiene actividad neurotrófica, lo cual implica un efecto de mayor latencia que la inhibición de la apoptosis [46, 48] y disminuye la excitotoxicidad neuronal, involucrada en muchas formas de lesión cerebral. Se ha identificado, además, la rHu-EPO como un mediador potente de la tolerancia a la isquemia.

Esta glicoproteína promueve la angiogénesis como respuesta a la hipoxia y al daño neuronal, al igual que otras citocinas inducidas por HIF-1 [48-51], al estimular la formación de microvasos mediante la interacción con su receptor en los vasos sanguíneos [41, 52].

Su acción antiapoptótica está dada por la activación mediada por r-EPO de JAK2, que conlleva a la activación del NF-κB y la sobreexpresión de los genes inhibidores de la apoptosis XIAP y c-IAP2 [48, 50, 51, 53]. En el hipocampo del gerbo, la rHu-EPO protege las neuronas del daño isquémico por sobreexpresión del gen Bcl-x [47]. La rHu-EPO inhibe la

Tabla 1. Reportes de algunos usos de la rHu-EPO como citoprotector

Modelo	Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Vía/dosis	Referencia
<i>In vitro</i> Cultivo primario de astrocitos	Rata	5-20 U/mL	[103]
Isquemia cerebral focal y global	Ratón	IP 25-100	[35]
Isquemia focal ACM	Rata	IN 4.8, 12, 24 U/kg	[85]
Isquemia focal ACM	Rata	IP 100, 1000, 5000 U/kg	[43]
Análisis de sangre	Primates no humanos	IV 500, 2000, 4000 U/kg SC 400, 1000, 2400, 5000, 20000 U/kg	[38]
Isquemia retinal	Ratón y rata	IP 5000 U	[72]
Hipoxia cerebral en neonatos	Ratón	IP 1000-5000U	[104]
Daño en el cordón espinal	Rata	IP 100-5000 U	[105]
Hemorragia Subaracnoidea	Conejo	IP 1000 U	[106]
Inflamación cerebral	Rata	IP 5000 U	[107]
Daño en los nervios periféricos	Rata	SC 1000-5000 U	[108]
<i>In vitro</i> Daño por anoxia	Neuronas de hipocampo	10 ng/mL	[51]
<i>In vitro</i> Daño por NO	Neuronas de hipocampo	10 ng/mL	[109]
Toxicidad al glutamato	Neuronas de corteza, hipocampo y cerebelo	50 ng/mL	[110]
Ruptura de la barrera hematoencefálica	Células endoteliales del cerebro	10 U/mL	[111]

expresión de Bax en células PC12, e incrementa la expresión de Bcl-XL, miembro del grupo de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 [47, 50, 54]. A su vez, estimula la supervivencia celular inhibiendo el complejo MAPK y PI3K/Akt que promueve la apoptosis [47]. Todo ello sugiere que sus efectos comprenden el control del balance de expresión de moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas [32].

La neuroprotección atribuida a la rHu-EPO puede deberse también a su efecto antiinflamatorio [53]. La administración de rHu-EPO en la isquemia focal en ratas disminuye notablemente la migración de células inflamatorias al tejido isquémico, atenuando la producción de citocinas proinflamatorias y disminuyendo el tamaño de la lesión [5, 12, 42, 47]. La expresión de eritropoyetina se inhibe notablemente por citocinas inflamatorias y por especies reactivas de oxígeno [49, 55, 56]. Ello podría contribuir a la acción de estos mediadores en la patogénesis de la isquemia y explicar por qué la administración exógena de rHu-EPO puede ser especialmente beneficiosa [19].

Se plantea también que la rHu-EPO podría ejercer su efecto antiinflamatorio por inhibición de la señalización molecular por parte de las neuronas dañadas [19]. En experimentos *in vitro* [51, 57, 58] que usan cocultivos de células gliales y neuronales donde la muerte neuronal está asociada con la liberación de factores que inducen la liberación de TNF por células gliales, se ha evidenciado que la acción antiinflamatoria de la rHu-EPO protege dichas células.

Teniendo en cuenta las propiedades de rHu-EPO, Ehrenreich y sus colaboradores realizaron el primer ensayo clínico con rHu-EPO en isquemia cerebral aguda, con una ventana terapéutica entre las primeras ocho horas. Los autores reportaron una reducción significativa del área infartada en los pacientes tratados, asociada con una notable recuperación neurológica y

15. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* (1997); 51:416-8.

16. Van der Meer P, Voors A, Lipsic E, Van Meer G, Dirk J, Van Veldhuisen D. Erythropoietin in cardiovascular diseases. *Eur Heart J* (2004); 25:285-91.

17. Vital M. Accidente cerebrovascular: esperanza en la investigación; 1999. Ref Type: Internet Communication

18. Castillo J, Marti-Vilalta JL, Martínez-Vila E, Matias-Guiu J. Manual de enfermedades vasculares cerebrales. Barcelona, España; 1999:388.

19. Villa P, van BJ, Larsen AK, Gervien J, Christensen S, Cerami A, Brines M, Leist M *et al*. Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* (2007); 27:552-63.

20. Castillo J. Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral. Formación continuada para farmacéuticos de hospitales [4]; 95-121. 2002. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España. Ref Type: Conference Proceeding.

21. Kwakkel G, Kollen B, Lindeman E. Understanding the pattern of functional recovery after stroke: Facts and theories. *Restor Neural Neurosci* (2004); 22:281-99.

22. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx* (2004); 1:36-45.

una mejoría clínica, un mes después de la isquemia [59]. El incremento de los niveles de rHu-EPO en suero y de líquido cefalorraquídeo (LCR) sugieren que la rHu-EPO cruza la barrera hematoencefálica dañada y protege el daño isquémico cerebral, como indican otros investigadores [60]. No se han observado efectos colaterales tras el tratamiento con rHu-EPO en la isquemia o en otras enfermedades neurodegenerativas [61]. Los resultados de Ehrenreich y sus colaboradores revelan que la rHu-EPO mejora la oxigenación del tejido cerebral y reduce el volumen de infarto, lo cual le confiere un excelente aval para su utilización como neuroprotector contra la isquemia cerebral [62].

Se ha reportado el uso de rHu-EPO en modelos de animales de hemorragia subaracnoidea [63], hemorragia intracraneal [64], trauma craneoencefálico [65, 66] y en el daño de la médula espinal [67, 68]. También se ha demostrado que reduce el daño neuronal funcional en modelos de encefalitis y de esclerosis múltiple [69, 70], mejora la neuropatía del diabético [71] y la isquemia de la retina [72]. Recientemente se ha descrito su acción cardioprotectora en perros [66], y además para tratar la esquizofrenia [73], la hipoxia perinatal [74-76] y en tratamientos colaterales para el mejoramiento de la calidad de vida en los pacientes con cáncer [13,77]. Debido a sus efectos estimuladores sobre la plasticidad neuronal, el empleo de la rHu-EPO pudiera tener efectos sobre la recuperación a largo plazo en pacientes discapacitados por ECV o enfermedades neurodegenerativas [78].

Administración intranasal de rHu-EPO con bajo contenido en ácidos siálicos (rHu-EPOb)

La mayoría de los agentes terapéuticos neuroprotectores efectivos en biomodelos de isquemia cerebral fallan por no ser clínicamente tolerados. A esta realidad se suma que no existe una droga que sea lo suficientemente efectiva, específica y de seguro acceso al SNC, que justifique su uso como neuroprotector en la fase aguda de la isquemia cerebral [18, 79-83].

De acuerdo con varios autores, la administración de moléculas protectoras como la rHu-EPO es una alternativa terapéutica potencial para contrarrestar los daños isquémicos agudos [10, 11]. Se ha demostrado que esta molécula tiene, además, efecto neuroprotector *in vitro* e *in vivo*, lo cual indica su actividad antiexcitotóxica, antiapoptótica, angiogénica y neurogénica.

En el 2002 comenzó un estudio piloto en humanos que demostró efectos beneficiosos de la aplicación intravenosa de la molécula de rHu-EPO con infarto cerebral agudo [59]. Actualmente, en los estudios donde se ha utilizado como neuroprotector en modelos de isquemia cerebral, se ha administrado por las vías intracerebroventricular, intraperitoneal e intravenosa [84, 85].

El empleo de la rHu-EPO por vía sistémica implica un riesgo potencial de estimulación de la eritropoyesis, la cual incrementa la cantidad de células y, como consecuencia, la viscosidad de la sangre, efecto no deseado en los pacientes con infarto cerebral. Una sangre menos fluida lleva a un empeoramiento de la hemodinamia cerebral en la región afectada e introduce una complicación adicional [86]. Por lo tanto, la búsqueda de derivados de rHu-EPO sin actividad eritropoyética, pero

que conserven sus propiedades neuroprotectoras, es la propuesta de varios grupos de investigadores. Se han reportado derivados asialilados y carbamilados de la molécula [87], que no tienen actividad hematopoyética y que sí provocan efectos neuroprotectores después de insultos cerebrales agudos.

Empleando esta molécula de rHu-EPOb con bajo contenido en ácido siálico, muy parecida a la EPO sintetizada en el cerebro en condiciones de isquemia, se tienen resultados muy similares (en los modelos de isquemia del gerbo de Mongolia y la rata) a los reportados por otros autores que emplearon la molécula íntegra de rHu-EPO o los derivados asialilados y carbamilados [88, 89]. La atenuación de la discapacidad de aprendizaje inducida por la isquemia que ocasionó la rHu-EPOb, podría explicarse por su efecto de mejorar la transmisión sináptica durante la isquemia. Ello se ha demostrado en modelos *in vitro* [90]. También se habla que la rHu-EPO estimula la función y la viabilidad neuronal a través de la activación de canales de Ca⁺⁺ y la liberación de neurotransmisores [35].

Se puede especular que esta molécula puede favorecer los mecanismos de restauración y neuroplasticidad en los animales isquémicos propuestos por algunos grupos de investigadores [78]. Esto abriría nuevas posibilidades terapéuticas para estimular la regeneración del tejido y la recuperación de áreas cerebrales usando un método seguro y no invasivo, como es la vía intranasal. Este estudio propone esta vía de administración como solución novedosa para hacer llegar la rHu-EPOb al cerebro. Como se ha descrito, la región olfatoria tiene atributos anatómicos y fisiológicos únicos que definen vías extracelulares e intracelulares hacia el SNC, que evaden la BHE [91, 92]. Varias sustancias llegan al SNC por inhalación, y se ha reportado el paso de moléculas tróficas y neuroprotectoras a través de esa vía [93].

La región olfatoria tiene atributos anatómicos y fisiológicos únicos que definen vías extracelulares e intracelulares hacia el SNC, que evaden la barrera hematoencefálica [91, 94]. En la parte superior de la cavidad nasal se encuentran las terminales nerviosas responsables de conducir la información del olor. Por los orificios de la placa cribiforme pasan los haces de cordones nerviosos que constituyen el tracto olfativo del SNC, que se extiende desde la base del cerebro a diferentes regiones subcorticales (Figura 2). Esto permite que la administración de pequeñas cantidades de rHu-EPOb penetren rápidamente al cerebro y difunda por el líquido intersticial. Por lo tanto, la vía intranasal puede ser utilizada para el tratamiento profiláctico y terapéutico del SNC [95].

Aplicar la rHu-EPOb por la vía intranasal no tiene que pasar por el hígado, donde sería degradada antes de llegar al SNC, debido a que su contenido en ácido siálico es bajo (valores por debajo 10 moléculas de ácidos siálicos/mol de proteínas) y es rápidamente destruida por las enzimas proteasas.

En esta investigación se confirmó el paso de la molécula al SNC y el efecto que produce tras su administración intranasal [85, 96]. Su detección, tanto en los bulbos olfatorios como en el cerebro, demuestran el contacto de la molécula con el LCR, lo cual se demostró por el significativo aumento en el LCR del *Macaca fascicularis* a los cinco minutos de ser administrado

23. Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: Molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis* (2004); 17:7-18.

24. Secades JJ, Varez-Sabin J, Rubio F, Lozano R, Davalos A, Castillo J. Citicolina in intracerebral haemorrhage: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre pilot study. *Cerebrovasc Dis* (2006); 21:380-5.

25. Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* (2006); 26: 1465-78.

26. Muir KW. Magnesium for neuroprotection in ischaemic stroke: rationale for use and evidence of effectiveness. *CNS Drugs* (2001); 15:921-30.

27. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of Stroke: Lessons from animal models. *Metab Brain Dis* (2004); 19:151-67.

28. Fisher M. The ischemic penumbra-identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis* (2004); 17(1): 1-6.

29. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995); 92: 3717-20.

30. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* (2004); 43: 649-59.

31. Wenger RH, Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* (1997); 378:609-16.

32. Gassmann M, Heinicke K, Soliz J, Ogunshola O. Non-erythroid functions of erythropoietin. In: Roach RC, ed. *Hypoxia: Through the lifecycle*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York; 2003:1-8.

33. Kalialis LV, Olsen NV. Erythropoietin--a new therapy in cerebral ischemia? *Ugeskr Laeger* 2003; 165:2477-81.

34. Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence? *Clin Breast Cancer* (2002); Suppl 3:S109-15.

35. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* (2004); 207: 3233-42.

36. Lipsic E, Schoemaker RG, Van der Meer P, Voors AA, Van Veldhuisen D, Van Gilst WH. Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* (2006); 48:2161-7.

37. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, Mackenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* (1999); 19: 643-51.

38. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* (1996); 8:666-76.

39. Juul SE, Anderson D, Li Y. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* (1998); 43:40-9.

por la vía nasal [97]. Por tanto, la vía intranasal permite que la rHu-EPOb tenga un acceso rápido y efectivo a diferentes regiones del cerebro.

Cuando se aplicó la rHu-EPOb por la vía intranasal en el gerbo de Mongolia, no se observó el edema del hemisferio correspondiente a la oclusión permanente de la carótida. En el propio modelo, hubo una reducción significativa de la mortalidad, así como de los signos clínicos de infarto a las 24 horas. Al administrar rHu-EPOb, se logró una supervivencia de 66% en las hembras y de 73% en los machos, contrastado con el 47 y el 57%, respectivamente, al tratarlos con vehículo [98].

La incidencia de eventos histopatológicos en el tejido cerebral a los siete días de la oclusión unilateral de la carótida fue significativamente menor en animales tratados con rHu-EPOb por vía intranasal durante los cuatro días posteriores a la oclusión. En el modelo de oclusión bilateral de las carótidas durante 6, 8 y 10 minutos, el tratamiento con rHu-EPOb disminuyó la muerte neuronal retardada en el sector CA1 del hipocampo [99]. En ambos modelos se evidenció un efecto preservador de la conducta de habituación en la actividad exploratoria espontánea, en animales tratados con rHu-EPOb, lo cual demostró la conservación de la integridad estructural en las regiones cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria a corto y largo plazo [96].

En el modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas durante dos horas, los animales tratados con rHu-EPOb por vía intranasal mostraron menores volúmenes de tejido isquémico y un mejor estado clínico a las 48 horas (resultados no publicados). Los resultados de esta investigación en roedores muestran eficacia terapéutica tanto en la fase aguda y crónica de la isquemia, como en modelos de isquemia reperusión, lo que sugiere efectos neuroprotectores en la estructura y función cerebral. Estas constituyen evidencias indirectas del paso de la molécula de rHu-EPOb por la vía intranasal en cantidades equivalentes a la dosis terapéutica en condiciones de isquemia.

En la actualidad, la seguridad es una de las mayores exigencias que tiene cualquier producto biotecnológico. Se ha demostrado que la molécula de rHu-EPO es muy segura con una experiencia en su aplicación en pacientes por más de 20 años [100]. En ensayos recientes se demostró que la rHu-EPOb por la vía intranasal no estimula la hematopoyesis en ratones B6D2F1, mientras que en el *M. fascicularis* no se modifican los parámetros sanguíneos de hemoglobina y hematocrito a 14 días de la administración de rHu-EPOb intranasal (resultados no publicados). Estas evidencias sugieren ventajas adicionales del uso de la vía intranasal, la cual podría ser más segura y rápida que la vía intravenosa [101].

Una evaluación por un grupo de investigadores sobre el uso de la rHu-EPOb por vía intranasal como modo de aplicar medicamentos para tratamientos de enfermedades que afectan al SNC, plantea que en la última década alrededor del 11% de los medicamentos

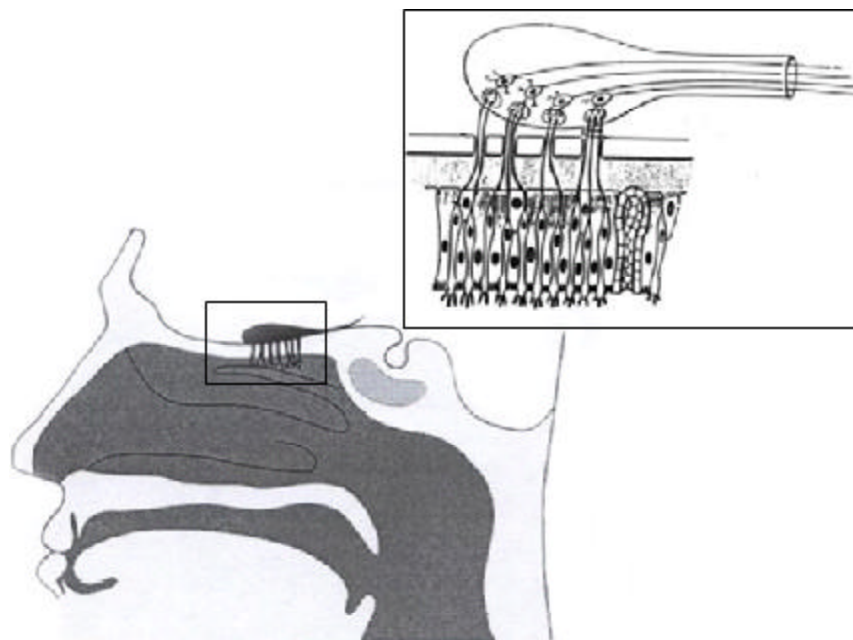


Figura 2. Esquema de la cavidad nasal. Estructura del epitelio olfatorio con la comunicación propuesta para el paso de sustancias por la vía intranasal al SNC.

elaborados por la industria farmacéutica son de este tipo. Los pacientes prefieren la administración intranasal debido a su eficacia y a la inocuidad de las formulaciones. Ese análisis aclara que este tipo de medicamento debe llevar rigurosos estudios de dosis que demuestren la seguridad, ya que es una vía de acceso muy rápida al SNC. El estudio de los excipientes, vehículos, conservantes y envases para este tipo de formulación también requieren estudios, ya que pudieran permitir la estabilidad de la formulación en el tiempo y por tanto mantener la eficacia demostrada en los estudios preclínicos [102].

Los resultados en los modelos tras la aplicación de la molécula de rHu-EPOb por la vía intranasal en cantidades equivalentes a la dosis terapéutica, en estudios preclínicos, demuestran el paso de la molécula al SNC. Su efecto terapéutico sobre la muerte celular y la función cerebral, así como en la seguridad en la fase aguda del infarto cerebral, tanto en modelos de isquemia e isquemia reperusión, demuestran así el efecto neuroprotector [98].

La estrategia de neuroprotección en el infarto cerebral es actualmente muy discutida entre los clínicos; sin embargo, es una propuesta de la investigación en las neurociencias con un fuerte basamento teórico y resultados preclínicos con moléculas como la rHu-EPOb, en los que se ha encontrado una aplicación muy importante en enfermedades cerebrovasculares y degenerativas que la convierte en un excelente candidato como citoprotector en el ser humano.

40. Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin-a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (2001); 251:179-84.

41. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi Met al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* (2004); 305: 239-42.

42. Catania MA, Marciano MC, Parisi A, Sturiale A, Buemi M, Grasso G, Squadrito F, Caputi AP et al. Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* (2002); 437:147-50.

43. Belayev L, Khoutorova L, Zhao W, Vighorichik A, Belayev A, Busto R, Magal E,

Ginsberg MD. Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* (2005); 36:1071-6.

44. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and me-

- tabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001); 98:4044-9.
45. Catania MA, Crupi A, Firenzoli F, Parisi A, Sturiale A, Squadrito F, Caputi AP, Calapai G. Oral administration of a soy extract improves endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *Planta Med* 2002; 68:1142-4.
46. Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* (2000); 401:349-56.
47. Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* (2000); 59:419-25.
48. Olsen N.V. Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin. *Clin Infect Dis* (2003); 37:323.
49. Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Cerami C, Itri LM. Neuroprotective properties of erythropoietin alfa. *Nephrol Dial Transplant* (2002);17(1):8-17.
50. Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Paediatr Suppl* (2002); 91:36-42.
51. Chong ZZ, Kang J, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* (2002); 106:2973-9.
52. Siren AL, Knerlich F, Schilling L, Kamrowski-Kruck H, Hahn A, Ehrenreich H. Differential glial and vascular expression of endothelins and their receptors in rat brain after neurotrauma. *Neurochem Res* (2000); 25:957-69.
53. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin exerts anti-inflammatory effect on the center nerves system in the model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* (2002); 952:128-34.
54. Cerami A. Beyond erythropoiesis: novel application for recombinant human erythropoietin. *Semin Hematol* (2001); 38:33-9.
55. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* (1999); 2:148-58.
56. Arango-Dávila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez GP, Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol* (2004); 39(2):156-65.
57. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuro-pathol Exp Neurol* (2001); 60:386-92.
58. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci* 2002;22:10291-301.
59. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Ceppek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
60. Siren AL, Knerlich F, Poser W. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* (2001); 101:271-6.
61. Eid T, Brines ML, Cerami A, Spencer DD, Kim JH, Schweitzer JS, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Increased expression of erythropoietin receptor on blood vessels in the human epileptogenic hippocampus with sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* (2004); 63:73-83.
62. Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M, Siren AL. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* (2004); 19:195-206.
63. Alafaci C, Salpietro F, Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, Morabito A, Tripodo E, Calapai G et al. Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* (2000); 406:219-25.
64. Sinn D, Chu K, Lee S. Erythropoietin has neuroprotective effects with functional recovery in experimental intracerebral hemorrhage. Disponible en: <http://www.abstracts2view.com/aan>. 57th Annual Meeting of the American Academy of Neurology. 2005. Ref Type: Internet Communication.
65. Lu D, Mahmood A, Qu C. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* (2005); 22:1011-7.
66. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* (2005); 19:1701-3.
67. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002); 99:2258-63.
68. Gorio A, Madaschi L, Di SB, Carelli S, Di Giulio AM, De BS, Coleman T, Cerami A et al. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005); 102:16379-84.
69. Sattler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M, Diem R. Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ* (2004); 11(2):S181-92.
70. Diem R, Sattler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M. Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain* (2005); 128:375-85.
71. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, Lauria G, Borgna M et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:823-8.
72. Becerra SP, Amaral J. Erythropoietin-an endogenous retinal survival factor. *Engl J Med* (2002); 347:1968-70.
73. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P et al. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry* (2004); 9:42-54.
74. Sola A, Rogjido M, Lee BH, Genetta T, Wen TC. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res* (2005); 57:481-7.
75. Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, Akhisaroglu M, Gokmen N, Duman N, Ulukus C, Genc S et al. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* (2003); 83:224-8.
76. Chang Y, Mu D, Wendland M. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res* (2005); 58:106-11.
77. Bohlus J, Langensiepen S, Schwarzer G. Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: results of a comprehensive meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* (2005); 97:489-98.
78. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the *in vitro* and *in vivo* production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* (2001); 21:9733-43.
79. Fisher M. El objetivo del tratamiento en la enfermedad cerebrovascular aguda y los enfoques terapéuticos neuroprotectores. *Rev Neurol* (1999); 29:536-44.
80. Hossmann K.A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cell Mol Neurobiol* (2006); 26:1057-83.
81. Ginsberg C, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* (1989); 20:1627-42.
82. Traysman RJ. Animals models of focal and global cerebral ischaemia. *JILAR* (2003); 44: 85.
83. Sosa I, García Salman JD. Isquemia cerebral y neuroprotección. Disponible en: www.monografias.com/trabajos45/isquemia-cerebral/isquemia-cerebral.shtml. 2007. Ref Type: Internet Communication.
84. Ehrenreich H, Siren AL. Erythropoietin for Treatment of Human Brain Disease: Experience from Proof-of-Concept Trials. In: Springer US, ed. Erythropoietin and the Nervous System. 2006.
85. Yu YP, Xu QQ, Zhang Q, Zhang WP, Zhang LH, Wei EQ. Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* (2005); 387:5-10.
86. Rogalewski A, Schneider A, Ringelstein EB, Schabitz WR. Toward a Multimodal Neuroprotective Treatment of Stroke. *Stroke* 2006; 37:1129-36.
87. Torup L, Leist M. Development of Non-Erythropoietic Erythropoietin Variants for Neuroprotection. In: Springer US, ed. Erythropoietin and the Nervous System. 2006.
88. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003); 100:6741-6.
89. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005); 102:2046-51.
90. Weber A, Maier RF, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas AG, Heinemann U, Obladen M et al. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* (2002); 958:305-11.
91. Hilger PA. Applied anatomy and physiology of the nose. En: Adams GL, Boies LR, Hilger PA, eds. Boies Fundamentals of Otolaryngology. Philadelphia: W. B. Saunders; 1989.
92. Illum L. Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *J Control Release* (2003); 87:187-98.

93. Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, DeFor TA, Frey WH. Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci* (2001); 187: 91-7.
94. Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discov Today* (2002); 7:1184-9.
95. Banks AW. Are the extracellular pathways a conduit for the delivery of therapeutics to the brain? *Curr Pharm Des* (2004); 10:1365-70.
96. Sosa I, García Rodríguez JC, Santana J, Subiros N, González C, Rodríguez Y, Rodríguez J. Intranasal administration of recombinant human Erythropoietin exerts neuroprotective effects on post-ischemic brain injury in Mongolian gerbils. *Pharmacologyonline* (2006); 1:100-12.
97. Sosa I, Cruz J, Santana J, Mengana Y, García JD, Ozuna GT, García JC. Paso de la molécula de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico al sistema nervioso central por la vía intranasal en los modelos del *Meriones unguiculatus* y el primate no humano *Macaca fascicularis*. *Rev Salud Anim* (2007); 29:1-6.
98. Sosa TI, García Salman JD. Neuroprotección en la isquemia cerebral. Experiencias con la eritropoyetina humana recombinante. *Rev Ecuat Neurol* (2007); 16(2). Disponible en http://www.medicosecuador.com/revecuatneurol/vol16_n2_2007/articulos_revision/neuroprotecciona.htm
99. Subiros N, García JC, González B, Sosa I, García JD. Evaluación histológica del efecto de la Eritropoyetina vía intranasal, sobre la muerte neuronal retardada en gerbos sometidos a isquemia cerebral transitoria. Estudio preliminar. 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica; 2005. Ref Type: Electronic Citation.
100. Bacardí DM, Cosme K, Porras DN, Rodríguez: Criterios preclínicos que sustentan el uso de la eritropoyetina recombinante humana. *Biotecnol Apl* (2005); 22:173-7.
101. Muñoz Cernuda A, León Rodríguez R, García Rodríguez JC, Nuñez Figueredo Y, Pardo Ruiz Z, García Salman JD, Sosa I, Curbelo Rodríguez D, et al. Formulaciones nasales de EPOhr con bajo contenido de ácido siálico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. [20050138]. 22-7-2005; Cuba. Ref Type: Patent.
102. Maggio ET. Recent developments in intranasal drug delivery technology are creating new vistas for peptide and protein therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* (2005); 3(4): 529-39.
103. Diaz Z, Assaraf MI, Miller WH Jr, Schipper HM. Astroglial citoprotection by erythropoietin pre-conditioning: implications for ischemic and degenerative CNS disorders. *J Neurochem* (2005); 93:392-402.
104. Kitagawa K, Matsumoto M, Matsushita K, Mandai K, Mabuchi T, Yanagihara T, Kamada T. Ischemic tolerance in moderately symptomatic gerbils after unilateral carotid occlusion. *Brain Res* (1996); 716:39-46.
105. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Childs Nerv Syst* (2003); 19:19-22.
106. Grasso G. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci* (2001); 45:7-14.
107. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* (2005); 6:484-94.
108. Zangheri EO, Suárez JR, Fernández FO, Campana H, Silva JC, Ponce FE. Erythropoietic action of tissue extracts. *Nature* (1962); 194:929-38.
109. Chabrier PE, Merle-Pallardy C, Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* (1999); 55:1029-35.
110. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* (1997); 76:105-16.
111. Martínez-Estrada OM, Rodríguez-Millan E, González D, Vicente E. Erythropoietin protects the *in vitro* blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci* (2003); 18:2538-44.

Recibido en abril de 2007. Aprobado en marzo de 2008.