
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**LA ERITROPOYETINA COMO AGENTE
NEUROPROTECTOR:
UNA POTENCIAL DROGA PARA EL
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Lic. Mónica Cristina Mattio

Directora: Dra. Marina Etcheverrigaray

Co-Director: Dr. Marcos Oggero Eberhardt

Laboratorio de Cultivos Celulares- Facultad de Bioquímica y
Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral

-2013-

***“Todo pasa y todo queda, pero lo nuestro es pasar,
Pasar haciendo caminos, caminos sobre la mar.
Caminante no hay camino, se hace camino al andar.”***

A. Machado

Y así fue, caminando, pasito a paso, este camino ha llegado a su final.

Durante su recorrido tuve la dicha de encontrarme con muchas personas excelentes que han dejado su huella y han aportado su granito de arena para que este trabajo dé sus frutos. Por ello, quisiera expresarle mi agradecimiento a cada uno de ellos.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral por permitirme desarrollar esta carrera de Doctorado en sus instalaciones.

Al CONICET, por otorgarme la beca para llevar a cabo este estudio.

Al Laboratorio de Cultivos Celulares, especialmente a Marina y Ricardo, por abrirme afectuosamente sus puertas y haberme permitido formar parte de su proyecto de investigación. Y a Zelltek S.A., por financiar parte de este trabajo.

A mi Directora, Marina, por haberme dirigido en este camino dándome algo muy valioso, la Libertad. Siempre atenta y abierta a todas las "ocurrencias" mías, aconsejándome y formándome en todo momento.

A mi Co-Director, Marcos, un gran maestro y luchador, que con una gran calidez humana me aconsejó, dirigió y guió durante este recorrido, por momentos más complicados pero siempre luchando para seguir. Gracias por enseñarme tanto!

A Nati, un gran pilar, que siempre estuvo dispuesta a ayudarme cuando fue necesario, dedicando muchas horas a este trabajo, guiando y discutiendo cada resultado. Gracias por todos los consejos, aportes, enseñanzas y charlas compartidas!

A Normix, mi gran asistente, compañera y amiga, que siempre estuvo dispuesta ayudarme y con quién no sólo compartí muchas horas de trabajo sino también muchas anécdotas, historias, charlas y risas! Gracias por todo el cariño y el apoyo!

A Gustavo O., el "Doc", un "personaje" y amigo, sin él gran parte de este trabajo no hubiese sido posible. Gracias Doc, no sólo por toda la dedicación y esfuerzo puesto en esto sino también por haber logrado que el tiempo en el bioterio se me haga más ameno, compartiendo las "alocadas" anécdotas de tu experiencias médicas y tantas charlas!

A los chiquis de la Ofi "the best office", Mili, Guli, Belu, Ale, Seba y Diego, por tanta horas compartidas no sólo en la oficina sino también en las mesadas de trabajo, por tanta charlas divertidas, por los hermosos momentos vividos, tantas anécdotas y por su amistad!

A Caro, una gran amiga, por el aguante y las largas charlas compartidas, por el tiempo dedicado, por sus aportes y sus consejos. Gracias Carito por tu calidez!

A Gise, la mejor secretaria, siempre atenta a todos mis pedidos con su mejor sonrisa y brindándome su gran ayuda con las correcciones del inglés! Gracias por todo!

A todos los integrantes del Laboratorio de Cultivos Celulares y Zelltek S.A., un grupo humano excelente con una calidez, un compromiso por el trabajo, un interés por el otro que no es común de hallar!...No quisiera olvidarme de nadie. A los chicos del analítico, Seba, Negro, Luciano y Carlitos por hacer que las horas en la mesada se hagan muy llevaderas!. A los chicos de fermentación, Iván, Nico, Cristian por sus aportes y su compañerismo. A las chicas de control de calidad, Ceci, Lore, Mari y Virgi, por abrirme las puertas de su "Lab" sin problemas y darme una mano con las técnicas analíticas. A Nacho, por su gran ayuda y sus aportes con la purificación! A Guille, Laura, Belu, Edu y Claudio por estar siempre dispuestos a contestar todas mis consultas y darme sus consejos. A los chicos de mantenimiento, Gustavo y Tito por estar siempre dispuestos a solucionar cualquier desperfecto. A los chicos del lavadero, Quique y Lucho, por la gran ayuda preparando el material y por el tiempo compartido de charlas y risas! A

Victor, por su colaboración manteniendo el orden y la limpieza. A los chicos de sistemas, Pancho, Lucho y Diego, por estar siempre dispuestos a solucionar los “problemitas” informáticos. A Valen, por enseñarme tanto sobre las normas y regulaciones y estar siempre atenta a mis consultas. A los más “peques” del Laboratorio, Eva, Luisi, Diane, Ile, Cele, Fabri y Regi por el tiempo y las charlas compartidas!. Espero no olvidarme de nadie! Gracias totales a todos por los años compartidos, los voy a extrañar!!!

Al Instituto de Biología Celular y Neurociencias y al Laboratorio de Neurotoxicidad, Neuroprotección y Neurorreparación, en especial a la Dra. Alicia Brusco por haberme abierto las puertas cálidamente. A Laura, por todo el tiempo dedicado, por su gran predisposición y por todo lo que me enseñó. A las chicas del “Lab”, Trini, Tami y Pau por el tiempo compartido durante mi estancia allí.

A los integrantes de la Cátedra de Microbiología, Cristina, Marice, José, Gabi, Marina, Martín, Fer, Romi, Ludmi, Eri y todas los pasantes y tesinistas por el tiempo compartido y por estar siempre dispuestos a reemplazarme cuando fuese necesario para que pudiera llevar a cabo este trabajo de tesis.

A las chicas de la Facu, Aye, Li, Ludmi y Nare, por escucharme, entenderme y alentarme en este recorrido, cargándome las pilas para continuar. Y por sobre todo, gracias por seguir formando parte de mi vida!

A mi Mamu, una luchadora incansable con mucha energía positiva y una fuerza de voluntad increíble, mi gran ejemplo, que me enseñó que siempre después de un tropezón hay que levantarse y seguir! Gracias Ma, por alentarme en cada paso que doy y darme esa calma tan necesaria para continuar en este camino.

A mi Papá, mi ángel guardián, que no tuvo la oportunidad de compartir este camino conmigo pero sin dudas siempre estuvo y estará a mi lado dándome las fuerzas para continuar. Gracias Pa, por tu ejemplo y por enseñarme a luchar por lo que uno quiere, con esfuerzo y sacrificio pero con mucha humildad.

A toda mi familia, abuela, tía/os y prima/os que a pesar de no comprender qué cosa rara hago...siempre se interesan y preguntan, escuchando con cara de sorpresa e incertidumbre, muy simpáticamente todas mis historias científicas! Gracias por estar! En especial, a mi tía Malvina, que estuvo presente en gran parte de este recorrido pero que partió antes de verme llegar al final del mismo, gracias por tantas charlas, exquisitos almuerzos domingueros y tanto amor!

A mi gordo, Conri, por ser mi gran compañero y amigo, por darme cada día una razón para seguir, por la gran paciencia que me tuvo durante este tiempo, entendiéndome y alentándome en todo momento. Gracias amor! A su familia, Carmelo, Stella, Vico, Marcos y Carmelita, por estar siempre dispuestos a ayudarme, escucharme y darme fuerzas para continuar.

Por último, y por sobre todas las cosas, a Dios por guiarme e iluminarme continuamente, dándome la fuerza de voluntad para enfrentar todas las adversidades y seguir adelante. Gracias!

Los resultados del presente trabajo de tesis han sido parcialmente presentados en diferentes Congresos Nacionales e Internacionales y/o publicados en revistas internacionales con referato según se detalla:

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

“Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity”. **Mattio, M.**; Ceaglio, N.; Oggero, M.; Perotti, N.; Amadeo, I.; Orozco, G.; Forno, G.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. *Biotechnology Progress* [ISSN: 8756-7938 (Printed), 1520-6033 (2011) (DOI: 10.1002/btpr.633) (Online)] (2011). 7(2): 1018-1028.

“Neuroprotective activity of a new erythropoietin formulation with increased penetration in the central nervous system”. Etcheverrigaray, M.; Ceaglio, N.; **Mattio, M.**; Oggero, M.; Amadeo, I.; Forno, G.; Perotti, N.; Kratje, R. *BMC Proceedings* (ISSN: 1753-6561) (2011) 5(8): 1-3.

“High performance collection of cerebrospinal fluid in rats: evaluation of erythropoietin penetration after osmotic opening of the blood-brain barrier”. Ceaglio, N.; Orozco, G.; Etcheverrigaray, M.; **Mattio, M.**; Kratje, R.; Perotti, N.; Oggero, M. *Journal of Neuroscience Methods* [(ISSN: 0165-0270), DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.07.009.] (2013) 219: 70-75.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina – II Congreso Internacional REDBIO Argentina. Rosario, 20-24 de Abril de 2009.

“Obtención y caracterización de derivados de eritropoyetina recombinante humana con superior actividad antiapoptótica en células PC-12”. **Mattio, M.**; Ceaglio, N.; Perotti, N.; Oggero, M.; Kratje, R.

LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y la LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, 18-21 de Noviembre de 2009.

“Obtención y caracterización de una nueva variante de eritropoyetina humana recombinante con actividad neuroprotectora in vitro”. **Mattio, M**; Ceaglio, N; Amadeo, I; Perotti, N; Oggero, M; Kratje, R; Etcheverrigaray, M.

Cell Culture Engineering XII. Banff (Alberta Canadá), 25-30 Abril de 2010.

“Neuroepoetin: novel combination of basic erythropoietin glycoforms with in vitro neuroprotective activity”. Ceaglio, N; **Mattio, M**; Perotti, N; Amadeo, I; Oggero, M; Kratje, R; Etcheverrigaray, M.

IV Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivo de Células. Montevideo (Uruguay), 7-9 de Noviembre de 2010.

“Glicoisoformas de eritropoyetina con propiedades neuroprotectoras, mínima actividad hematopoyética e incrementada penetración en el sistema nervioso central”. **Mattio, M**; Ceaglio, N; Amadeo, I; Forno, G; Perotti, N; Oggero, M; Kratje, R; Etcheverrigaray M.

LV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología y XLII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mar del Plata (Buenos Aires, Argentina), 17-20 de Noviembre de 2010.

“Parámetros farmacocinéticos de una nueva combinación de glicoisoformas de rhepo (neuroepoetin) con actividad neuroprotectora”. **Mattio, M**; Ceaglio, N; Orozco, G; Oggero, M; Perotti, N; Kratje, R; Etcheverrigaray M.

1er Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos. Rosario (Santa Fe, Argentina), 25 de Noviembre de 2010.

“Proceso de purificación para la obtención de una nueva combinación de glicoisoformas de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico”. **Mattio, M**; Ceaglio, N.; Oggero Eberhardt, M.; Perotti, N.; Amadeo, I.; Forno, G.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M.

22 nd ESACT Meeting 2011. Vienna (Austria), 15-18 de Mayo de 2011.

“Neuroprotective activity of a new erythropoietin formulation with increased penetration in the central nervous system”. Etcheverrigaray, M.; Ceaglio, N.; **Mattio, M**; Oggero, M.; Amadeo, I.; Forno, G.; Perotti, N.; Kratje, R.

XXVI Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencia. Huerta Grande (Córdoba, Argentina), 18-22 Octubre de 2011.

“ Neuroprotective effect of a new rhEPO analogue with low erythropoietic activity”.

Casalis, P.; Thomale, UW.; Ceaglio, N.; **Mattio, M.**; Perotti, N.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Oggero-Eberhardt, M.

LVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología 20111, II Congreso Nacional AACYTAL y IV Reunión Científica Regional por el Bienestar del Animal de Laboratorio y el Progreso de la Ciencia. Mar del Plata (Buenos Aires, Argentina), 16-19 de Noviembre de 2011.

“ Análisis de la N-glicosilación de una variante de eritropoyetina humana recombinante con reducida actividad eritropoyética y conservada acción neuroprotectora”. **Mattio, M.**; Ceaglio, N.; Oggero, M.; Perotti, N.; Forno, G.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M.

V Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares (V SLATCC). Santa Fe (Santa Fe, Argentina), 25- 27 de Octubre de 2012.

“Derivado de rhEPO como posible candidato para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson”. **Mattio, M.**; Ceaglio, N.; Perotti, N.; Oggero, M.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M.

LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata (Buenos Aires, Argentina), 14-17 de Noviembre de 2012.

“Reducción del daño cerebral isquémico empleando un derivado mejorado de eritropoyetina”. **Mattio, M.**; Caltana, L.; Ceaglio, N.; Oggero, M.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M.; Brusco, A.

INDICE

INDICE.....	8
RESUMEN.....	21
ABSTRACT.....	23
INTRODUCCIÓN.....	24
1.PANORAMA ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) Y SU TRATAMIENTO.....	24
2.ERITROPOYETINA.....	24
3.CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA EPO.....	24
3.1Gen y estructura primaria.....	24
3.2Estructura secundaria y terciaria.....	25
3.3Estructura de los carbohidratos.....	25
4.SITIOS DE PRODUCCIÓN.....	26
5.REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN.....	26
6.RECEPTORES.....	26
7.ROL BIOLÓGICO DE LA EPO.....	27
7.1Acción eritropoyética.....	27
7.2Acción citoprotectora.....	28
8.EPO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	28
8.1Expresión de EPO y EPOR en el cerebro.....	28
8.2Regulación de EPO y EPOR en el cerebro.....	28
8.3Cascada de señalización de la EPO en el cerebro.....	29
8.4Funciones de la EPO en el cerebro.....	29
8.4.1Durante el desarrollo.....	29
8.4.2Neuroprotección.....	29
8.4.2.1Propiedades antiapoptóticas.....	30
8.4.2.2 Efecto antiinflamatorio.....	30
8.4.2.3 Efecto antioxidante.....	30
8.4.2.4 Propiedades neurotróficas y regeneración neuronal.....	30
8.4.2.5 Potencial angiogénico.....	31
8.4.2.6 Propiedades antineurotóxicas.....	31
8.5EPO como un agente neuroterapéutico en enfermedades del sistema nervioso central.....	31
8.5.1Traspaso de la BHE.....	31
8.5.2Riesgos asociados con su aplicación.....	32
8.5.3Estrategias para la obtención de nuevos derivados.....	32
8.5.3.1Modificación química.....	32
8.5.3.2 Modificación del contenido de ácido siálico.....	32
OBJETIVOS Y PLAN DE TESIS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	35
9.LINEAS CELULARES.....	35
10.CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES.....	36
11.MEDIOS DE CULTIVO.....	36
12.SISTEMAS DE CULTIVO.....	37
12.1Mantenimiento celular y ensayos biológicos.....	37
12.2Biorreactor.....	37
13.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS VIABLES.....	38
14.CRIOPRESERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	38
15.REVITALIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	39
16.PURIFICACIÓN DE LA NUEVA VARIANTE DE rhEPO.....	39
16.1Material de partida y remoción de componentes insolubles.....	39
16.2Fase de captura: Cromatografía de afinidad a colorante.....	39

16.3 Fase de purificación intermedia: cromatografías de intercambio iónico	40
16.3.1 Cromatografía de intercambio iónico I	40
16.3.2 Cromatografía de intercambio iónico II	40
16.4 Fase de purificación final (Polishing)	41
16.5 Determinación de la concentración de proteínas totales	41
16.6 Parámetros evaluadores de la performance de purificación	41
17. MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE rhEPO	42
17.1 ELISA sándwich amplificado	42
17.2 Cromatografía en fase reversa	42
17.3 Espectrofotometría	42
18. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS ISOFORMAS DE rhEPO	43
18.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida	43
18.2 Espectrofotometría de masa MALDI-TOF	43
18.3 Isoelectroenfoque (IEF)	43
18.4 Electroforesis capilar zonal (ECZ)	43
19. EVALUACIÓN DE LOS OLIGOSACÁRIDOS UNIDOS TIPO N	44
20. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO SIÁLICO TERMINAL	44
21. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA HEMATOPOYÉTICA IN VITRO	44
22. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA HEMATOPOYÉTICA IN VIVO	45
23. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VITRO	45
23.1 Ensayo de evaluación de la viabilidad celular	45
23.2 Métodos para la evaluación de apoptosis	46
23.2.1 Detección de la condensación de la cromatina: Tinción con Hoechst	46
23.2.2 Marcación con TUNEL	47
23.3 Expresión de resultados y análisis estadístico	47
24. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE LAS VARIANTES DE rhEPO	47
24.1 Administración intravascular	48
24.2 Administración extravascular	48
24.2.1 Vía de inoculación intraperitoneal	48
24.2.2 Vía de inoculación subcutánea	48
24.3 Cuantificación de las variantes de rhEPO en las muestras biológicas	48
24.4 Análisis Farmacocinético	48
24.4.1 Administración intravascular. Análisis compartimental	48
24.4.2 Administración extravascular. Análisis no compartimental	51
25. EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMÁTOENCEFÁLICA	52
25.1 Construcción del dispositivo de punción	52
25.2 Extracción de LCR	52
25.3 Apertura osmótica de la BHE	53
25.4 Análisis farmacocinético	53
26. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VIVO	53
26.1 Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)	53
26.2 Diseño experimental y grupos experimentales	53
26.3 Análisis de la actividad motora	54
26.3.1 Índice de déficit neurológico (IDN)	54
26.3.2 Evaluación de la fuerza de las extremidades delanteras	54
26.3.3 Prueba del cilindro	55
26.3.4 Prueba de la esquina	55
26.4 Controles de rutina	55
26.5 Determinación del hematocrito	56
26.6 Sacrificio de los animales y procesamiento de los cerebros	56

26.7 Inmunohistoquímica.....	56
26.8 Determinación del volumen de infarto.....	56
26.9 Captura de imágenes digitales.....	57
26.10 Análisis morfométrico de las imágenes digitales.....	57
26.11 Análisis estadístico.....	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
1.PURIFICACIÓN DE UNA NUEVA VARIANTE DE rhEPO.....	59
27.CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE rhEPO.....	61
27.1 Evaluación de la masa molecular.....	61
27.2 Evaluación de la glicosilación.....	61
27.3 Evaluación de las isoformas presentes.....	64
28.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA IN VITRO E IN VIVO.....	65
28.1 Evaluación de la actividad hematopoyética in vitro.....	65
28.2 Evaluación de la actividad hematopoyética in vivo.....	66
29.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VITRO.....	66
29.1 Línea celular PC-12.....	67
29.1.1 Optimización de las condiciones del bioensayo.....	67
29.1.2 Efecto de las variantes de rhEPO.....	67
29.2 Línea celular SH-SY5Y.....	68
29.2.1 Optimización de las condiciones del bioensayo.....	68
29.2.2 Efecto de las variantes de rhEPO.....	69
30.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA DE LA NUEVA VARIANTE DE rhEPO EN CULTIVO DE CÉLULAS.....	70
30.1 Rol antiapoptótico de la nueva variante en cultivo de células SH-SY5Y.....	70
30.2 Rol antiapoptótico de la nueva variante en cultivo primario de neuronas corticales de rata.....	71
30.3 Rol antiapoptótico de la nueva variante en cultivo de células PC-12 diferenciadas con NGF durante 7 días.....	73
31.ANÁLISIS DE LA FARMACOCINÉTICA EN PLASMA DE LA rhNEPO Y LA rhEPO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	73
32.EVALUACIÓN DEL TRASPASO DE LA BARRERA HEMÁTOENCEFÁLICA DE LA rhNEPO Y LA rhEPO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	74
32.1 Traspaso de la barrera hematoencefálica de la rhNEPO y rhEPO luego de la administración endovenosa e intraperitoneal.....	75
32.1.1 Barrera hematóencefálica intacta.....	75
32.1.2 Permeabilización osmótica de la BHE.....	76
33.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL.....	77
33.1 Efecto de la MCAO y de los diferentes tratamientos sobre la ingesta de comida y el peso de los animales.....	77
33.2 Efecto de la MCAO y de los diferentes tratamientos sobre la actividad motora de los animales de experimentación.....	77
33.3 Evaluación del daño tisular y efecto de las variantes de rhEPO sobre el volumen de infarto.....	79
33.4 Efecto de la MCAO y los tratamientos sobre los procesos dendríticos.....	80
33.5 Efecto de la MCAO y los tratamientos sobre los neurofilamentos.....	80
33.6 Efecto de la MCAO y los tratamientos sobre la respuesta de la macroglía.....	82
34.Evaluación de la incidencia de las dosis diarias aplicadas a los animales sobre el hematocrito.....	83
CONCLUSIONES.....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
A	Absorbancia
ABC	Área bajo la curva
ABC _{0-1h}	Área bajo la curva de la concentración entre el tiempo 0 y 1 h posterior a su administración
ABC _{ev}	Área bajo la curva de la concentración de droga administrada por vía extravascular
ABC _{iv}	Área bajo la curva de la concentración de droga administrada por vía endovenosa
ABCM	Área bajo la curva de la concentración de droga por el tiempo en función del tiempo
A _c	Área del hemisferio contralateral
ACM	Arteria cerebral media
ACN	Acetonitrilo
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Actividad específica
AEPO	Asialoeritropoyetina
A _i	Área del hemisferio ipsilateral
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Ácido siálico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	<i>Buffer</i> acetato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BF	<i>Buffer</i> fosfato
BFU-E	<i>Burst Forming Unit-Erythroid</i>
BHE	Barrera hemátoencefálica
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BDNF	Factor derivado del cerebro
BrdU	Bromodeoxiuridina (5-bromo-2' deoxy-uridine)
BRP	Preparación biológica de referencia
BSA	Albúmina sérica bovina
βcR	Subunidad beta común de los receptores de citoquinas
C _{max}	Concentración máxima de la droga luego de su administración
C _p ⁰	Concentración inicial de la droga en plasma
C1	Primera vértebra de la columna vertebral
C ₅₀	Concentración que provoca una respuesta media
CA1	Cornu Ammonis del hipocampo
CAS	Contenido de ácido siálico
C _{AS}	Concentración ácido siálico
cél.	Células
CEPO	Eritropoyetina carbamilada

C_{EPO}	Concentración EPO
CFR	Cromatografía en fase reversa
CFU-E	<i>Colony Forming Unit-Erythroid</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CII	Cromatografía de intercambio iónico
CL	<i>Clearance</i>
CL_{app}	<i>Clearance</i> aparente
COM	Centro de organización de microtúbulos
C_p	Concentración plasmática
C_{PI}	Concentración proteína de interés
CPN	Células progenitoras neuronales
C_{PT}	Concentración proteínas totales
C_t	Concentración de la droga en el compartimiento tisular
CX	Corteza cerebral
d	distancia
D	Días post-MCAO
D_0	Dosis de droga administrada
D_p^0	Dosis inicial inyectada
DAB	tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina
D_{ev}	Masa de droga administrada por vía extravascular
D_{iv}	Masa de droga administrada por vía endovenosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
D_p	Cantidad de droga en plasma
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung con Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
D_t	Cantidad de droga en el compartimiento tisular
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Receptor de EPO
EPOR ₂	Receptor de EPO homodimérico
FP	Factor de purificación
GBO	<i>Greiner Bio-one</i>
G-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína glio-fribilar ácida
GM-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos
GPX	Glutation peroxidasa
HCP	<i>haematopoietic cell phosphatase</i>
HERs	Elementos de respuesta a hipoxia
HNF-4	Factor nuclear del hepatocito
HPAEC	Cromatografía de intercambio iónico alto pH
HPLC	Cromatografía líquida de alta <i>performance</i>
IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IDN	Índice de déficit neurológico
IEF	Isoelectroenfoque

IGF-1	Factor de crecimiento insulínico
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IL	Índice de lateralidad
ILN	Índice de lateralidad normalizado
JAK	Proteína kinasa <i>Janus</i>
k_{10}	Constante de eliminación de la droga hacia el exterior del organismo
k_{12}	Constante de velocidad de transferencia de la droga fuera del torrente sanguíneo
k_{21}	Constante de velocidad de transferencia de la droga dentro del torrente sanguíneo
K_{aap}	Constante de absorción aparente
K_{aaf}	Constante de afinidad aparente
KIE	<i>kidney-inducibility element</i>
L	Longitud del paso
LCC	<i>Cell Line Services</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LIE	<i>Liver-inducibility element</i>
λ	Longitud de onda
MALDI	desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz
MAP2	Proteína asociada a microtúbulo 2
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media
MD	Medio de diferenciación
M_F	Masa de proteína de interés recuperada en el proceso de purificación
M_I	Masa de proteína de interés sembrada en el proceso de purificación
MM	Masa molecular
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonfenil)-2H-tetrazolium
N_2	Nitrógeno
NF-200	Neurofilamento
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NO	Óxido nítrico
NRE	Regiones reguladoras negativas
ODD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	O-fenilendiamina
PAD	detección amperométrica pulsada
PAGE	Electroforesis en gel de poliagrilamida
PAS	<i>Per-Arnt-Sim</i>
PBS	Solución salina de fosfatos
PDH	Prolil-4 hidroxilasa
PFA	Paraformaldehído
pl	Punto isoeléctrico
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PMS	Metasulfato de fenazina

R	Recuperación
Rf	Movilidad electroforética relativa
rhEPO	Eritropoyetina humana recombinante
rhEPO-CHO.K1	Clon productor de rhEPO
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rtPA	Activador de plasminógeno tisular recombinante
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S ₀	Momento estadístico de orden cero
S ₁	Momento estadístico de orden uno
S ₂	Momento estadístico de orden dos
SC	Suero de caballo
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Error estándar medio
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SNO	Suero normal de cabra
SSC	Solución salina citrato formamida
STP	Estaurosporina
t	Tiempo
t _{1/2α}	Tiempo de vida media de distribución de la droga
t _{1/2β}	Tiempo de vida media de eliminación de la droga
TAD	Dominio de transactivación
TFA	Ácido trifluoracético
TMA	Tiempo medio de absorción
T _{max}	Tiempo para alcanzar la C _{max}
TMR	Tiempo medio de residencia
TMR _{ev}	Tiempo medio de residencia extravascular
TMR _{iv}	Tiempo medio de residencia intravascular
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TOF	Tiempo de vuelo
TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
TR	Tiempo de residencia
UI	Unidades internacionales
UI	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
VC	Volumen de columna
V _D	Volumen de distribución
V _{DSS}	Volumen de distribución aparente en el estado estacionario
VHL	<i>von Hippel Lindau</i>
V _p	Volumen del compartimiento central
V _P	Volumen del plasma
VRT	Varianza del tiempo medio de residencia

X	Concentración de células
X _M	Células muertas
X _T	Células totales
X _v	Células viables
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr

UNIDADES

Å	amstrong
°C	grado Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
g	gramo
h	hora
kDa	Kilodalton
kg	kilogramo
l	litro
M	molar
m ²	metro cuadrado
mA	miliamper
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar

mm	milímetro
MΩ	mega-ohmio
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro
N	normal
ng	nanogramo
nm	nanómetro
pM	picomolar
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
U	Unidades
UI	Unidades internacionales
V	voltio
W	vatio
% (V/V)	mililitros de solvente en 100 ml de solución
% (P/V)	gramos de soluto en 100 ml de solución

RESUMEN

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína perteneciente a las citoquinas de tipo I que se caracteriza por su funcionalidad pleiotrópica. El rol biológico principal de esta hormona está relacionado con la estimulación de glóbulos rojos en la médula ósea y el mantenimiento de la homeostasis sanguínea, por lo que históricamente se ha utilizado para el tratamiento de pacientes con anemia derivada de insuficiencia renal crónica. Sin embargo, con el hallazgo de la expresión de la EPO y su receptor en otros tejidos no hematopoyéticos, se planteó un nuevo rol de esta molécula, fundamentalmente como una citoquina protectora de tejidos, principalmente en el cerebro. En este tejido ha evidenciado un rol antiapoptótico y neuroprotector por lo que ha sido propuesta para tratar anomalías del sistema nervioso central (SNC). No obstante, su utilización para el tratamiento de estas patologías puede conllevar a la aparición de efectos adversos asociados a su actividad eritropoyética, tales como elevación de la masa de glóbulos rojos, hipertensión y fenómenos protrombóticos.

En el presente trabajo de tesis se desarrolló un proceso de purificación alternativo de la hormona producida en células CHO.k1 (rhEPO) para obtener una combinación de glicofomas de EPO que se denominó *Neuroepoetin* (rhNEPO), la cual presentó una composición de isoformas menos ácidas (rango pI 4.2-6.1) y menor contenido de ácido siálico ($8,0 \pm 1,0$ mol/mol de proteína). Así como también demostró mayor contenido de estructuras neutras, mono-, di- y tri-sialidades con respecto a las existentes en la rhEPO (en total 81,4% y 30%, respectivamente) y, por lo tanto, menor porcentaje de oligosacáridos tetrasializados (13,6%) con respecto a rhEPO (58,1%). Además, la rhNEPO presentó 45,6% más estructuras de oligosacáridos neutros menos ramificadas (di- y tri-antenarias).

Estas características se tradujeron en una actividad eritropoyética *in vivo* prácticamente nula, siendo sólo del 4% con respecto a la hormona hematopoyética. A pesar de esto, no se detectaron cambios en su afinidad por el receptor en ensayos *in vitro* en células UT-7/EPO ($1,25 \pm 0,60 \times 10^{11}$ l.mol⁻¹ y $1,30 \pm 0,63 \times 10^{11}$ l.mol⁻¹), pero sí con la línea celular TF-1, donde la nueva combinación presentó una mayor afinidad por el receptor con respecto a rhEPO ($4,82 \pm 0,64 \times 10^{10}$ l.mol⁻¹ y $2,93 \pm 0,15 \times 10^{10}$ l.mol⁻¹, respectivamente).

La caracterización farmacocinética plasmática se realizó empleando diferentes vías de administración: endovenosa y extravasculares (subcutánea e intraperitoneal). Como era esperable, las diferencias observadas en el perfil de glicosilación de la rhNEPO incrementaron su depuración plasmática en 9,5 veces para la vía endovenosa y en 12,8 y 18,3 veces para las vías extravasculares, respectivamente.

La capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica fue analizada mediante la evaluación de la farmacocinética de las variantes de rhEPO en el LCR empleando las vías de administración endovenosa e intraperitoneal. La rhNEPO fue capaz de ingresar al líquido cefalorraquídeo más rápidamente que su contraparte hematopoyética en concentraciones dentro del rango de citoprotección utilizando ambas vías de inoculación, siendo la máxima concentración alcanzada en LCR del 0,1 al 0,6 % de la máxima concentración plasmática, no existiendo diferencias entre rhNEPO y rhEPO.

Con el fin de incrementar el pasaje de estas moléculas, se evaluó la apertura osmótica de la BHE utilizando una solución hiperosmolar de manitol y se observó que si bien este porcentaje de transferencia se mantuvo prácticamente constante, la rhNEPO alcanzó una concentración máxima 1,6 veces superior a la observada en ausencia de este polialcohol. Por su parte, la rhEPO no alcanzó mayores concentraciones sino que el uso de manitol permitió anticipar su ingreso al SNC, detectándose a los 5 min post-inyección en comparación con los 30 min que debieron transcurrir para detectarla cuando fue administrada en ausencia del mismo.

La acción neuroprotectora de esta nueva combinación fue evaluada *in vitro* en células SH-SY5Y (indiferenciadas y diferenciadas) y PC-12 (diferenciadas a fenotipo neuronal con NGF) sometidas a distintos estímulos apoptóticos. En los ensayos de proliferación con células SH-SY5Y en estado proliferativo, la rhNEPO fue capaz de preservar la viabilidad celular a menor concentración que la rhEPO luego de someter las células a la neurotoxina 6-OHDA. Este mismo comportamiento fue observado luego de inducir apoptosis a las células PC-12 diferenciadas mediante supresión de suero y factor de crecimiento nervioso. En cambio, en las células SH-SY5Y sometidas a diferenciación y apoptosis mediante incubación con STP, ambas variantes mostraron efecto protector de la supervivencia celular similar.

El rol antiapoptótico de la *Neuroepoetin* fue evaluado *in vitro* empleando líneas celulares establecidas (SH-SY5Y indiferenciadas y PC-12 diferenciadas) así como cultivo primario de neuronas corticales de rata. En las células SH-SY5Y expuestas al estímulo apoptótico 6-OHDA, la rhNEPO fue capaz de reducir el porcentaje de células apoptóticas a una menor concentración con respecto a rhEPO. Sin embargo, en la línea celular PC-12 y en el cultivo primario de neuronas corticales de rata, a la misma concentración la rhNEPO fue más efectiva para disminuir la apoptosis. En prácticamente todos los casos la rhNEPO disminuyó la apoptosis entre 40 y 60% con respecto al control de muerte.

Finalmente, la actividad neuroprotectora fue evaluada *in vivo* empleando un modelo de isquemia cerebral focal mediante oclusión de la arteria cerebral media en

ratones Balb/c. En esta oportunidad, ambas variantes de rhEPO permitieron una recuperación del estado neurológico de los animales luego del daño ocasionado por la oclusión de dicha arteria. Asimismo, se observó que ambas variantes tendieron a disminuir el volumen de infarto del tejido cerebral entre 35% y 42%. A nivel morfológico, en la región CA1 del hipocampo, se preservó la respuesta astrogliar luego de los tratamientos con rhEPO o rhNEPO, mientras que la expresión de MAP2 y NF-200 se incrementó con respecto a los animales tratados sólo con el vehículo. Estos resultados indicarían que los tratamientos con rhEPO y rhNEPO no sólo permiten una disminución de la respuesta inflamatoria ocasionada por la MCAO en dicha región sino también favorecen la recuperación de la arborización dendrítica y la preservación de la estructura neuronal.

En resumen, este trabajo de tesis permitió obtener una nueva combinación de isoformas de rhEPO que mantuvo o mejoró las propiedades neuroprotectoras y antiapoptóticas de la rhEPO, lo cual se manifestó tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* y, al mismo tiempo, presentó prácticamente nula actividad hematopoyética *in vivo*, postulando a la rhNEPO como un potencial candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein belonging to type I cytokine which is characterized by its pleiotropic functionality. The major biological role of this hormone is related to the stimulation of red blood cells in bone marrow and maintaining blood homeostasis. Therefore, it has been used always to treat patients with anemia resulting from chronic renal failure. However, with the discovery of the expression of EPO and its receptor in other non-hematopoietic tissues, a new role for this molecule has arisen, mainly as a tissue protective cytokine in the brain. In this tissue, it has shown an antiapoptotic and neuroprotective role. Therefore, it has been proposed for the treatment of abnormalities of the central nervous system (CNS). However, its use for the treatment of these conditions can lead to adverse effects associated with erythropoietic activity such as elevated red blood cell mass, hypertension and thrombotic phenomena.

In this thesis we developed an alternative purification process of the hormone produced in CHO cells (rhEPO) to obtain a new combination of EPO glycoforms called *Neuroepoetin* (rhNEPO), which presented a composition of less acidic isoforms (range pI 4.2-6.1) and lower sialic acid content (8.0 ± 1.0 mol/mol protein). Besides, it showed a higher content of neutral, mono-, di- and tri- sialylated structures with respect to those in rhEPO (in total 81.4% and 30%, respectively) and, therefore, lower percentage of tetrasialylated oligosaccharides (13.6%) compared to rhEPO (58.1%). Furthermore, rhNEPO presented 45.6% more less branched neutral oligosaccharide structures (di- and tri-antennary).

These characteristics translate into practically null *in vivo* erythropoietic activity, with only 4% with respect to the hematopoietic hormone. Despite this, there were no changes in receptor affinity *in vitro* assays in UT-7 cells ($1.25 \pm 0.60 \times 10^{11}$ l.mol⁻¹ and $1.30 \pm 0.63 \times 10^{11}$ l. mol⁻¹). However, there were changes with the cell line TF-1, where the new combination showed higher affinity for the receptor with respect to rhEPO ($4.82 \pm 0.64 \times 10^{10}$ l.mol⁻¹ and $2.93 \pm 0.15 \times 10^{10}$ l.mol⁻¹, respectively).

Plasmatic pharmacokinetics characterization was performed using different routes of administration, intravenous and extravascular (subcutaneous and intraperitoneal). As expected, the differences observed in the different glycosylation profile of the rhNEPO increased their plasma clearance and hence diminished hematopoietic capacity.

The ability to cross the blood brain barrier was evaluated by studying the pharmacokinetics of rhEPO variants in CSF pathways using intravenous and intraperitoneal administration. At this time, despite the reduced half-life in plasma,

rhNEPO was able to enter the cerebrospinal fluid faster than its hematopoietic counterpart within the range of concentrations for both cytoprotection inoculation sites, and the maximum concentration achieved in CSF for rhEPO and rhNEPO was 0.1 to 0.6% of the maximum plasmatic concentration, without differences between them.

In order to increase the transfer of these molecules, osmotic opening of the BBB was assessed using a hyperosmolar solution of mannitol and it was observed that while the transfer rate was essentially constant, the maximum concentration reached for rhNEPO was 1.6 times higher than that achieved in the absence of this polyalcohol. On the other hand, rhEPO did not reach higher concentrations but it was detected earlier in the CSF.

The neuroprotective action of this new combination was evaluated *in vitro* in SH-SY5Y cells (undifferentiated and differentiated) and PC-12 (differentiated neuronal phenotype with NGF) subjected to different apoptotic stimuli. In proliferation assays with SH-SY5Y cells in proliferative stage, the rhNEPO was able to preserve cell viability at lower concentration than rhEPO after subjecting the cells to the neurotoxin 6-OHDA. The same behavior was observed to induce apoptosis in differentiated PC-12 cells by withdrawal of serum and NGF. In contrast, in SH-SY5Y cells subjected to differentiation and apoptosis by incubation with STP, both variants showed a similar protective effect on cell survival.

Antiapoptotic role of *Neuroepoetin* was evaluated *in vitro* using established cell lines (undifferentiated SH-SY5Y and differentiated PC-12) as well as primary cultures of rat cortical neurons. In SH-SY5Y cells exposed to 6-OHDA apoptotic stimulus, rhNEPO was able to reduce the percentage of apoptotic cells at a lower concentration compared to rhEPO. However, in PC-12 cell line and in the primary culture of rat cortical neurons, rhNEPO at the same concentration was more effective to decrease apoptosis. In virtually all cases, rhNEPO decreased apoptosis between 40 and 60% with respect to death control.

Finally, the neuroprotective activity was assessed *in vivo* using a model of focal cerebral ischemia by occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) in Balb/c mice. This time, both variants of rhEPO allowed recovery of neurological status of the animals after the damage caused by the occlusion of the artery. It was also noted that both variants tended to reduce the volume of brain tissue infarction between 35% and 42%. At morphological level, it was observed that the reactive astrogliosis did not change after treatments with rhEPO or rhNEPO, but there was an increase in the expression of proteins MAP2 and NF-200. These results suggest that treatment with rhEPO and rhNEPO allow dendritic arborization recovery and preservation of neuronal structure, which were significantly reduced in animals receiving vehicle only.

In summary, this thesis work yielded a new combination of rhEPO isoforms that maintained or improved neuroprotective and antiapoptotic properties of rhEPO, which is expressed both *in vitro* and *in vivo* and, at the same time, showed virtually no hematopoietic activity *in vivo*, suggesting that rhNEPO is a potential therapeutic candidate for the treatment of central nervous system diseases.

INTRODUCCIÓN

“Saber para

[Auguste Comte](#)



INTRODUCCIÓN

1. PANORAMA ACTUAL DE LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) Y SU TRATAMIENTO.

Las enfermedades asociadas al SNC son aquellas que pueden afectar el cerebro o la médula espinal, resultando en desórdenes neurológicos o psiquiátricos. Las principales causas de su aparición son traumas, infecciones, degeneración, desórdenes autoinmunes, defectos estructurales, tumores o accidentes cerebrovasculares (ACV). Entre ellas, las ocasionadas por la degeneración neuronal o por ACV son las que atraen la atención de los principales centros de investigación, debido a que las primeras son de etiología poco conocida, extremadamente heterólogas y, para la gran mayoría, no existe actualmente en el mercado un tratamiento eficaz que logre su cura, y las segundas son los causantes del 85% de las muertes ocasionadas por trastornos neurológicos ([World Health Organization, 2006](#)).

Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ([2006](#)), las patologías relacionadas al SNC afectan en todo el mundo a unos mil millones de personas y son una importante causa de mortalidad. Se estima que para el año 2015, representen el 11,84% de las muertes ocurridas a nivel mundial.

Actualmente, su tratamiento apunta a disminuir los síntomas y desacelerar el proceso de la enfermedad pero no necesariamente a detener su avance. Por lo que se plantea la necesidad de hallar estrategias de tratamientos que permitan tratar dichas patologías de una manera exitosa garantizando su curación. Esta carencia ha llevado a que en los últimos años creciera considerablemente el interés por el desarrollo de agentes neuroprotectores que permitan alcanzar dicha meta en forma segura y eficaz.

Fundamentalmente, el objetivo de la industria farmacéutica radica en encontrar compuestos que sean capaces de atacar puntos clave y comunes en el desarrollo de muchas de las enfermedades del SNC, tales como apoptosis, estrés oxidativo, inflamación, disfunción metabólica y neuroplasticidad comprometida.

Este campo de aplicación está en amplio crecimiento y se espera que el mercado mundial para estos agentes supere los U\$S 2,6 billones en el 2014, con un renovado crecimiento en el 2017 como consecuencia de la culminación de muchas de las pruebas que actualmente se encuentran en fase clínica y de esta manera las drogas podrían ser aprobadas para su comercialización ([Visiorgain, 2012](#)).

Hasta el momento se han evaluado más de 500 compuestos con estas características, dentro de los cuales encontramos compuestos nuevos obtenidos mediante la tecnología del ADN recombinante y moléculas ya establecidas farmacéuticamente para otras aplicaciones y a las cuales no se les conocía, hasta

entonces, un efecto neuroprotector. Un claro ejemplo para este último caso, es el papel casi protagonista que ha despertado en las últimas décadas la eritropoyetina.

2. ERITROPOYETINA

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína perteneciente a las citoquinas de tipo I que está caracterizada por su funcionalidad pleiotrópica.

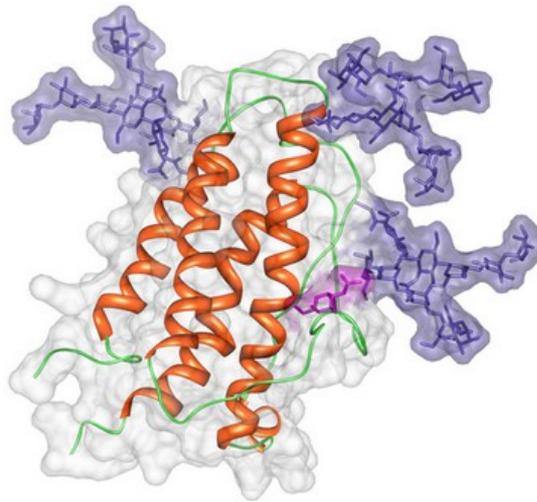


Fig. 1. Representación gráfica de la estructura molecular de la EPO humana.

Obtenida de <http://glycam.ccruc.uga.edu/ccrc/>

La historia de este factor tiene sus inicios hacia el año 1839 cuando el científico R. Bright describió por primera vez la anemia asociada a la insuficiencia renal. Sin embargo, nada se sabía acerca de la causa de dicho efecto.

Años más tarde, en 1863, el médico D. Jourdanet reconoció en forma indirecta la existencia de una relación entre la menor presión parcial de oxígeno en sangre y la elevación del número de eritrocitos cuando realizaba determinaciones de hematocrito a personas que habían permanecido mucho tiempo viviendo en las alturas, y constató que la sangre de estas personas era más viscosa que la de sus pacientes “normales” ([Jourdanet, 1863](#)). Tres décadas después, en 1893, F. Miescher describió la formación de eritrocitos como resultado de una disminución de oxígeno en la médula ósea ([Melli y col., 2006](#)).

Recién en 1906, el francés P. Carnot y su colaboradora C. Deflandre plantearon por primera vez la hipótesis de la existencia de un factor humoral eritroregulador que explicaba sus observaciones de laboratorio, ya que advertían la inducción de reticulocitos en conejos sanos inyectados con el plasma derivado de conejos

anémicos. A este factor lo llamaron “hemopoetina”(Carnot and Deflandre 1906) (Carnot 1906)([Carnot y DeFlander, 1906](#)).

Durante muchos años, diferentes grupos de investigación trataron de reproducir esta hipótesis y recién en 1948 dos nefrólogos finlandeses, E. Bonsdorff y E. Jalavisto, le dieron el nombre de eritropoyetina ([Bonsdorff y Jalavisto, 1948](#)). Sin embargo, se considera como verdadero “descubridor” al científico A. Erslev quien fue el primero en publicar en 1953 un artículo científico donde probaba sin duda alguna la existencia de esta hormona ([Erslev, 1953](#)). Pocos años después, Goldwasser y colaboradores demostraron que la eritropoyesis estaba gobernada por la relación entre la oferta y la demanda de oxígeno e identificaron al riñón como el sitio de producción de dicha hormona ([Jacobson y col., 1957](#)).

Transcurrieron 20 años hasta que [Miyake y col. \(1977\)](#) lograron purificar unos pocos miligramos a partir de la orina humana.

A partir de 1983, cuando Lin identificó el gen de la EPO humana, comenzaron los intentos para su clonación en distintos sistemas biológicos empleando la tecnología de recombinación del ADN. El primer reporte de su clonación y expresión en un sistema biológico procarionte (*Escherichia coli*) data de 1984 ([Lee-Huang, 1984](#)), y en un cultivo de células de mamífero (células de hámster de ovario chino, CHO) recién se logró en 1985 ([Lin y col., 1985](#)). A partir de este año, se hizo posible la producción de la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) en grandes cantidades para el tratamiento de anemias.

3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA EPO

3.1 Gen y estructura primaria

El gen de la EPO en el humano está representado como una copia simple en el cromosoma 7 en la posición 7q11-7q22. Está conformado por 5,4 kpb y presenta 5 exones (582 pares de bases) y 4 intrones (1,5 kpb). Este gen se encuentra altamente conservado entre las especies y en la mayoría de las eritropoyetinas de mamíferos existe un 80 % de homología en su secuencia aminoacídica ([Wen y col., 1993](#)).

Este gen codifica una proteína de 193 aminoácidos que durante las modificaciones post-traduccionales sufre la remoción de un péptido señal de 27 aminoácidos del extremo N-terminal, generándose una proteína madura de 166 aminoácidos. Asimismo, exhibe una profusa N-glicosilación en tres sitios determinados por las Asn N24, N38 y N83 ([Lai y col., 1986](#)), una O-glicosilación en la Ser S126 ([Browne y col., 1986](#); [Egrie y col., 1986](#)) y la formación de dos puentes disulfuros entre los residuos de Cys C7-C161 y C29-C33. Finalmente, antes de ser liberada a la

circulación esta proteína sufre la eliminación de un residuo de Asn del extremo C-terminal, quedando de este modo una proteína final de 165 aminoácidos (Fig.2).

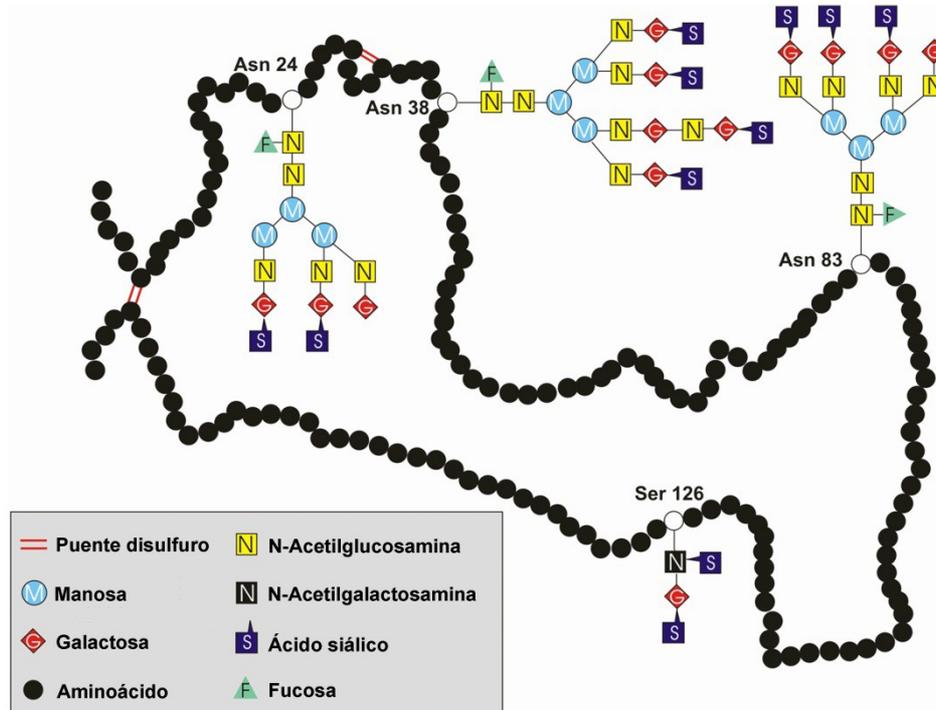


Fig. 2. Estructura primaria de la hEPO.

Representación gráfica de la estructura primaria de la hEPO. En la misma se pueden observar los puentes disulfuro y la ubicación de la cadena de los carbohidratos. Adaptada de [Jamiri \(2006\)](#).

La presencia de los carbohidratos unidos a la cadena polipeptídica originan una glicoproteína cuya masa molecular ronda entre 30 y 39 kDa, dependiendo del método analítico empleado para su determinación. Tales carbohidratos están formados por monosacáridos de manosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y N-acetilneuramínico. Estos azúcares representan aproximadamente entre un 35 y 40% de su masa molecular, presentando la cadena polipeptídica no glicosilada una masa molecular aproximada de 18 kDa.

3.2 Estructura secundaria y terciaria

La estructura secundaria y terciaria que presenta la EPO es común a todas las citoquinas de tipo I. Se caracteriza por presentar 4 alfa hélices antiparalelas denominadas A, B, C y D, con asas largas cruzadas entre las dos primeras A-B y las

dos últimas hélices C-D y, además, presenta dos hojas beta ([Boissel y col., 1993](#); [Cheetham y col., 1998](#); [Syed y col., 1998](#)).

A partir del estudio de su estructura se han identificado cuatro sitios importantes para su actividad biológica hematopoyética, los cuales se encuentran localizados en la hélice A (Val 11, Arg 14 y Tyr 15), hélice C (Ser 100, Arg 103, Ser 104 y Leu 108), hélice D (Asn 147, Gly 151 y Leu 155) y en el asa que conecta las hélices A-B (residuos 24-51). Estas regiones determinan los dos sitios de unión al receptor. El sitio 1 está determinado por las porciones de las hélices A y C y el sitio 2 lo determinan los aminoácidos detallados de la hélice D y el asa A-B ([Brines y col., 2008](#); [Elliott y col., 1997](#); [Elliott y col., 1996](#)). Los sitios de adición de carbohidratos se encuentran ubicados en una zona distal de la molécula con respecto al sitio de unión al receptor ([Egrie y Browne, 2001](#)).

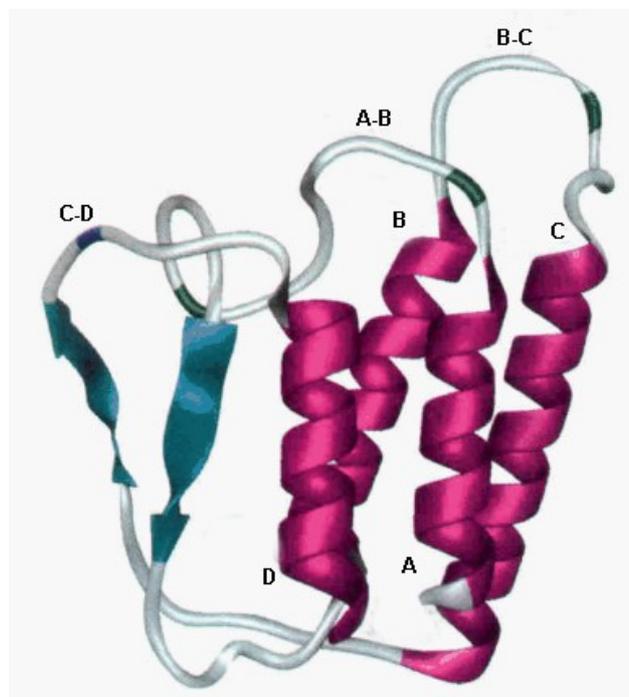


Fig. 3. Modelo de la estructura tridimensional de la hEPO.

Representación gráfica en forma de cintas de la estructura tridimensional de la EPO predicha empleando el diagrama de Ribbon. Las cuatro hélices α (color magenta) se designan con las letras A-D. Las interconexiones entre las hélices se designan con la letra de las hélices que conectan. Dos regiones de la estructura que podrían formar uniones de hidrógeno entre las conexiones AB y CD están representadas en color cian. Los sitios de N y O glicosilación están indicados en color verde y azul, respectivamente. No se visualizan los puentes.

Adaptada de [Boissel y col. \(1993\)](#).

3.3 Estructura de los carbohidratos

A diferencia de la estructura aminoacídica constante de la molécula de EPO, las estructuras de azúcares son variables. En este sentido, se habla de microheterogeneidad de la molécula, la cual se presenta no sólo en la molécula natural sino también en la EPO obtenida en forma recombinante. Esta heterogeneidad está determinada, en parte, por secuencias variables de monosacáridos en las cadenas laterales y, por otra parte, por una cantidad variable de ácido N-acetilneuramínico (Ácido siálico, AS) ([Sasaki y col., 1987](#); [Sasaki y col., 1988](#); [Takeuchi y col., 1988](#); [Tsuda y col., 1990](#)). Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación en la misma proteína pueden contener diferentes estructuras de carbohidratos. Además, en el mismo sitio de glicosilación de diferentes moléculas pueden encontrarse diferentes estructuras. Esta heterogeneidad es consecuencia de la síntesis no templada de los carbohidratos ([Egrie y Browne, 2001](#)).

Las cadenas de carbohidratos unidas a los sitios de N-glicosilación pueden contener dos, tres o cuatro ramificaciones (o antenas), cada una de las cuales finaliza con una molécula de AS cargada negativamente. Por otro lado, el carbohidrato unido en el sitio de O-glicosilación puede contener hasta dos moléculas de AS (Fig. 4).

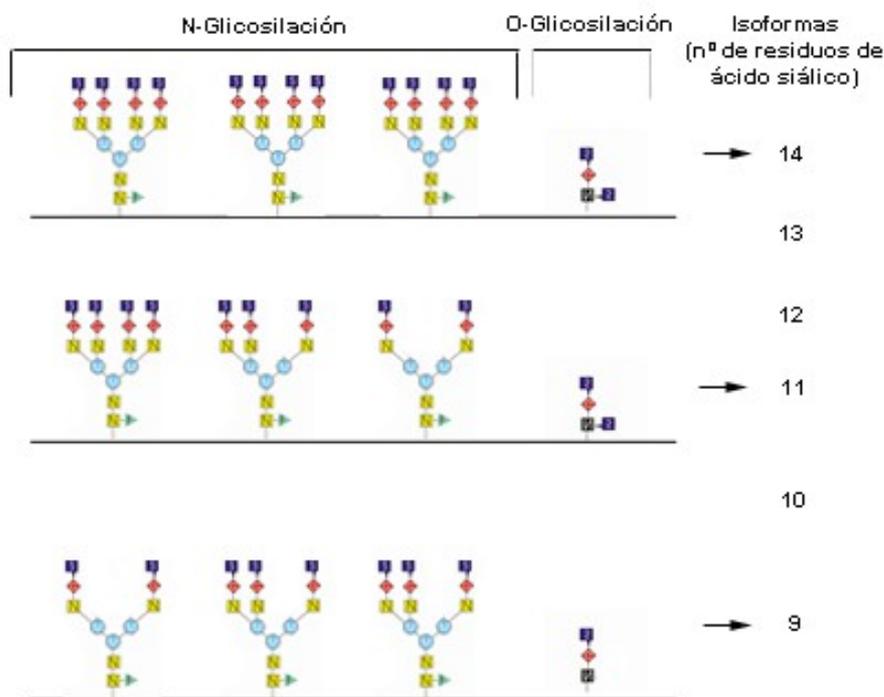


Fig. 4. Esquema de la estructura de los carbohidratos de EPO y designación de las isoformas.

Representación gráfica de la variabilidad que pueden presentar los carbohidratos en cuanto a la antenaridad y al contenido de ácido siálico (cuadrado azul). Adaptada de [Egrie y Browne \(2001\)](#).

Todos los azúcares presentes en la molécula son neutros con la única excepción del ácido siálico que exhibe una carga negativa y le determina el carácter ácido a la proteína. La variabilidad en la estructura de los azúcares determina variaciones en el número de moléculas de ácido siálico y, por lo tanto, afecta la carga negativa neta de la molécula. Teniendo en cuenta esto, una isoforma de EPO se define como la subpoblación de moléculas de EPO que comparten la misma carga neta.

En conclusión, tanto la hEPO como su forma recombinante consisten en un conjunto de isoformas cuya diversidad en el contenido de ácido siálico es responsable de la heterogeneidad observada en sus puntos isoeléctricos.

Tanto la presencia de los carbohidratos como el contenido de ácido siálico terminal son de sumo interés al momento de evaluar la actividad biológica de la EPO. Por un lado, la adición de los glúcidos es necesaria para la correcta biosíntesis, secreción, estabilidad y actividad de la hormona ([Delorme y col., 1992](#); [Dubé y col., 1988](#); [Narhi y col., 1991](#)) y por otro lado, el ácido siálico es decisivo para la actividad biológica *in vivo* de las glicoproteínas, ya que cuanto mayor es el contenido de ácido siálico más prolongada es la vida media de la hormona en sangre ([Byrne y col., 2007](#)).

4. SITIOS DE PRODUCCIÓN

La EPO es uno de los pocos factores de crecimiento hematopoyético que se caracteriza por su efecto endócrino, y el único cuya producción está regulada por la tensión del oxígeno tisular.

Durante la gestación la EPO es producida en el hígado. Sin embargo, al momento del nacimiento o poco tiempo después y en la vida adulta, los riñones pasan a ser los sitios principales de producción ([Tilbrook y Klinken, 1999](#)). En este último órgano son las células fibroblastoides peritubulares de la corteza interna y de la médula externa las encargadas de esta tarea ([Koury y col., 1988](#)). En esta zona, la expresión de EPO es constitutiva y máxima en cada célula en condiciones de normoxia mientras que se produce un reclutamiento de fibroblastos intersticiales adicionales cuando la tensión de oxígeno tisular disminuye.

En el hígado, la EPO es producida por los hepatocitos y las células no parenquimatosas, presentando mayor expresión las células que se encuentran en zonas donde la tensión de oxígeno es baja (próximas a las venas centrales) y pudiendo ser regulada positivamente cuando la hipoxia aumenta ([Ebert y Bunn, 1999](#); [Koury y col., 1991](#)).

Las células del riñón presentan una sensibilidad diferencial a la hipoxia en comparación con las del hígado. Cuando la hipoxia es leve, el incremento de la

expresión de EPO es mucho mayor en los riñones que en el hígado, y sólo cuando la hipoxia es más grave la síntesis hepática adquiere importancia ([Tan y col., 1991](#)).

A pesar de ser estos dos órganos los principales productores de eritropoyetina, se ha detectado la expresión de esta hormona en otros tejidos tales como el cerebro ([Bernaudin y col., 2000](#); [Masuda y col., 1994](#)), bazo ([De Franciscis y col., 1964](#)), pulmón ([Fandrey y Bunn, 1993](#)), médula ósea, órganos reproductores ([Ascensao y col., 1983](#); [Kobayashi y col., 2002](#)), entre otros ([Arcasoy, 2008](#); [Haase, 2013](#)). Sin embargo, en casos de insuficiencia renal crónica estos órganos no son capaces de suplantar la producción renal, que representa entre el 80 y 85 % de la producción total ([Jelkmann, 2011](#)). En condiciones de normoxia, hasta el momento no se ha demostrado una contribución importante de estos tejidos a la eritropoyesis normal, lo cual sugiere la participación de la EPO de forma autócrina/parácrina en estos tejidos, modulando por ejemplo la angiogénesis y la viabilidad celular ([Jelkmann, 2007](#)).

5. REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN

La síntesis de esta hormona está controlada por diferentes secuencias reguladoras presentes en el ADN, las cuales pueden actuar de forma positiva o negativa. Dentro de las regiones reguladoras negativas (NRE; del inglés, *negative regulatory element*) se encuentran sitios de unión para GATA-2 ([Tsuchiya y col., 1997](#)) y NF- κ B ([La Ferla, 2002](#)). Este último, actúa como un inhibidor de la síntesis de EPO fundamentalmente en enfermedades inflamatorias y no está afectado por las condiciones de hipoxia, mientras que GATA-2 bajo esta condición disminuye su expresión ([Imagawa, 2003](#)).

Por otro lado, las secuencias potenciadoras también denominadas elementos de respuesta a hipoxia (HRE; del inglés, *hypoxia response elements*) en el riñón se encuentran en el extremo 5' (KIE; del inglés, *kidney-inducibility element*), mientras que en el hígado están en el extremo 3' (LIE; del inglés, *liver-inducibility element*) ([Köchling y col., 1998](#)). Estas regiones son activadas por los factores inducibles por hipoxia (HIFs).

Inicialmente, en ensayos *in vitro*, se consideró a HIF-1 como el responsable de la regulación de la expresión de la EPO ([Wang y Semenza, 1995](#)). Sin embargo, en los últimos años HIF-2 surgió como el principal regulador de la expresión de esta hormona *in vivo* ([Haase, 2010](#); [Warnecke y col., 2004](#)).

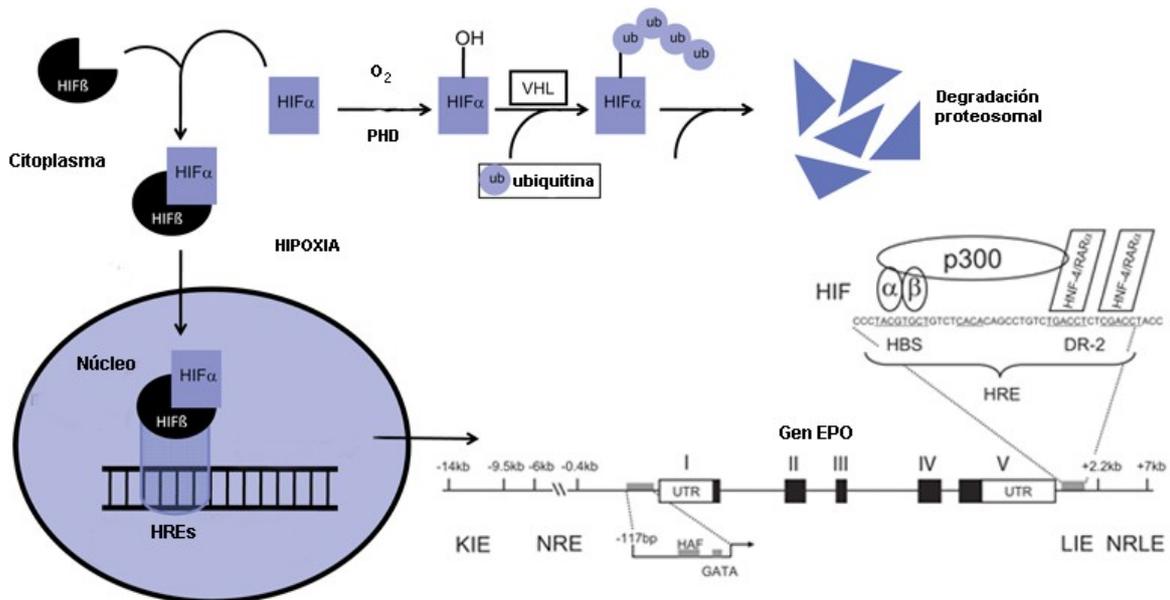


Fig. 5. Regulación de la expresión de EPO

En condiciones de normoxia, HIF α es hidroxilado en dos residuos de Pro por la PHD (Prolil-4 hidroxilasa) y en uno de Asn. La hidroxilación de las Pro permite la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su ubiquitinación y degradación en el proteosoma. En condiciones de hipoxia, HIF- α evade la degradación y se une a HIF- β para luego, en forma de dímero, unirse a los HREs presentes en el gen de EPO. El gen de EPO cuenta con elementos reguladores negativos (NRE o NRLE) y elementos inducibles (KIE o LIE) en el riñón y en el hígado, respectivamente. Una vez que el dímero HIF α/β se une permite el reclutamiento de los coactivadores transcripcionales p300 y CREB activando la transcripción del gen. En el tejido hepático, los HIFs además, cooperan con el HNF-4. Adaptado de [Fandrey \(2004\)](#) y [Heyman y col. \(2011\)](#).

Estos factores son heterodiméricos y están compuestos por una subunidad α sensible al O₂ (120 kDa) y una subunidad β (90-95 kDa) cuya expresión es constitutiva. Ambas subunidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, conteniendo un dominio bHLH (del inglés, *basic helix-loop-helix*) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN ([Wang y col., 1995](#)). La subunidad α contiene, en el extremo C-terminal, un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) y un dominio de transactivación (TAD), los cuales sufren hidroxilaciones en residuos de Pro y Asn, respectivamente. Los residuos blanco son Pro 402/564 y Asn 803 en HIF-1 α y Pro 405/531 y Asn 847 en HIF-2 α ([Haase, 2013](#); [Jiang y col., 1997](#)). Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL a los sitios hidroxilados de HIF- α formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su ubiquitinación y degradación en el proteosoma ([Huang y col., 1998](#); [Salceda y Caro, 1997](#)). En ausencia de oxígeno, HIF-1 α es

activado mediante una fosforilación mientras que HIF-2 α mediante una deacetilación mediada por una proteína llamada Sirt1 ([Dioum y col., 2009](#)). Una vez activada la subunidad α trasloca al núcleo, donde dimeriza con HIF- β y se une a los HREs, permitiendo el reclutamiento de los coactivadores transcripcionales p300 y CREB y finalmente activando la transcripción del gen. En el tejido hepático, los HIFs además, cooperan con el factor nuclear del hepatocito [HNF-4 ([Ebert y Bunn, 1999](#); [Haase, 2013](#))] (Fig. 5).

El HIF-2 no sólo está asociado a la regulación de la expresión de la EPO sino también al metabolismo del hierro, lo que sugiere que esta co-regulación es necesaria para cubrir la demanda de hierro causada por la estimulación de la eritropoyesis ([Haase, 2013](#)).

6. RECEPTORES

El gen del receptor de la EPO (EPOR) está constituido por 8 exones y 7 intrones y se encuentra en el cromosoma 19 en humanos, en la posición p13.3-p13.2. Éste codifica una glicoproteína de 508 aminoácidos con un péptido señal de 24 aminoácidos que es removido para dar lugar a una proteína final que consta de un dominio extracelular determinado por 224 aminoácidos, un dominio transmembrana con 24 aminoácidos y un dominio intracelular de 236 aminoácidos ([Vives Corrons, 1998](#)).

Su masa molecular es aproximadamente de 56 kDa antes de sufrir las modificaciones post-traduccionales que incluyen una N-glicosilación y fosforilaciones. Luego de ello, se han observado masas moleculares aparentes hasta de 78 kDa en el receptor unido a la membrana ([Vives Corrons, 1998](#)).

Como este receptor pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I se caracteriza por presentar en el dominio extracelular cuatro residuos de Cys conservadas y un motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) próximo al dominio transmembrana. Carece de actividad enzimática en el dominio citosólico, el cual cuenta con dos cajas denominadas box 1 y box 2 esenciales para el anclaje de las janus kinasas (JAKs) ([Bazan, 1990](#); [Ihle y col., 1995](#)) (Fig. 6).

Estas proteínas JAKs tienen actividad de tirosina-quinasa y son indispensables para desencadenar la cascada de señalización intracelular iniciada por la unión de la EPO a su receptor ([Watowich, 2011](#)).

Cuando una molécula de EPO se une a sus receptores a través de sus sitios 1 y 2 (ver apartado 4.2) induce cambios conformacionales y una estrecha unión entre ellos. Esto conlleva a la transactivación de las proteínas JAK2 que se encuentran

unidas a la región citoplasmática (box1 y box2) de los EPOR y, como consecuencia, ocho residuos de Tyr del EPOR son fosforilados generando sitios de acoplamiento para las proteínas señalizadoras con dominios SH2 (del inglés, *SRC homology 2*) que activan algunos factores de transcripción tales como los STATs o NF- κ B.

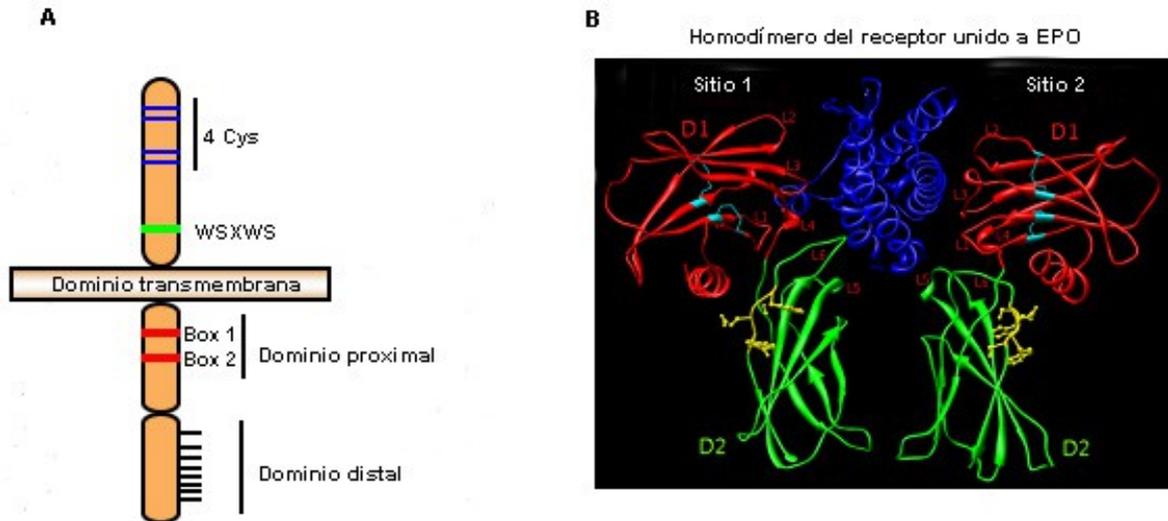


Fig. 6. Estructura del receptor homodimérico de EPO

- A.** Representación gráfica de los dominios que conforman el EPOR.
B. Estructura tridimensional del homodímero de EPOR una vez que éste se une a la EPO (Azul), D1 corresponde al dominio extracelular (rojo), D2 al dominio intracelular (verde), el motivo WSXWS está representado en amarillo y los puentes disulfuro en cian. Adaptado de <http://maptest.rutgers.edu/drupal/?q=node/279>.

Otras de las principales vías de señalización que desencadena la unión de EPO a su receptor son la vía de PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt y la vía Ras/MAP kinasas ([Dawson, 2002](#); [Rossert y Eckardt, 2005](#)) (Fig. 7).

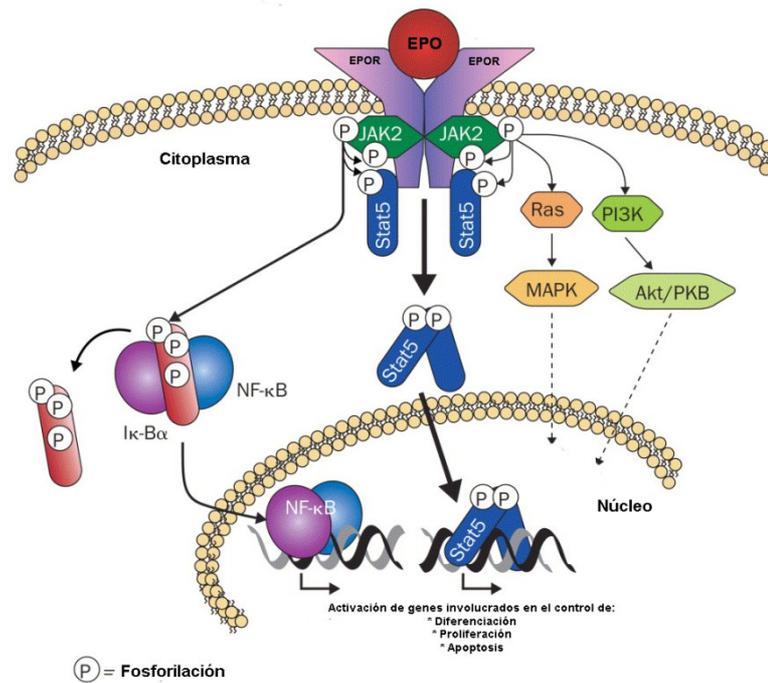


Fig. 7. Cascada de señalización desencadenada por la unión de EPO a EPOR.

La unión de la EPO a su receptor desencadena una cascada de señalización intracelular que culmina con la activación de NF-κB, STAT5, Ras/MAPK y PI3K/Akt. Adaptado de [Dawson \(2002\)](#).

A través de estas vías, entre otras, la EPO no sólo ejerce un efecto sobre la diferenciación y proliferación celular sino también un rol antiapoptótico ([Dawson, 2002](#); [Rossert y Eckardt, 2005](#)).

El efecto de esta activación culmina cuando las fosfatasa HCP (del inglés, *haematopoietic cell phosphatase*) catalizan la desfosforilación de las JAK2 ([Klingmüller y col., 1995](#); [Yi y col., 1995](#)).

El receptor de la EPO no sólo se expresa en los progenitores eritroides primarios sino también en otros tejidos no hematopoyéticos tales como cerebro, retina, corazón, riñón, células del músculo liso, mioblastos y endotelio vascular ([Arcasoy, 2008](#)).

7. ROL BIOLÓGICO DE LA EPO

Si bien el rol principal de la EPO está relacionado a la estimulación de la producción de glóbulos rojos y el mantenimiento de la homeostasis sanguínea, en los últimos años, con el hallazgo de la expresión de la EPO y su receptor en otros tejidos no hematopoyéticos, se planteó un nuevo rol de esta molécula, fundamentalmente como una citoquina protectora de tejidos.

A partir de esto, se pueden definir dos roles principales de esta molécula. Por un lado, una función eritropoyética (rol endócrino) y, por otro, una función citoprotectora (rol autócrino/parácrino). Estas dos funciones no se interfieren, ya que para ejercer un efecto citoprotector se requiere una alta producción de EPO focalmente en los tejidos que no puede ser provista por el nivel basal de EPO circulante con finalidad eritropoyética ([Konstantinopoulos y col., 2007](#)).

7.1 Acción eritropoyética

La producción de glóbulos rojos está regulada por diferentes citoquinas, que participan en diferentes estadios de la diferenciación celular. Dentro de estos factores de crecimiento eritropoyético se encuentran el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), las interleuquinas (IL) 1, 3, 4, 6, 9 y 11, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento insulínico (IGF-1) y la EPO.

En su rol hormonal la EPO actúa sobre los receptores específicos que se encuentran sobre la membrana de las células precursoras eritroides tempranas BFU-E (del inglés, *Burst Forming Unit-Erythroid*) y, especialmente, sobre las células más maduras CFU-E (del inglés, *Colony Forming Unit-Erythroid*) promoviendo su sobrevivencia, proliferación y diferenciación, mediante la cascada de señalización anteriormente descrita (apartado 7). El resultado final es la liberación de reticulocitos a la sangre periférica.

El número de receptores varía en las distintas células del linaje eritroide, desde las BFU-E hasta los normoblastos inmaduros, siendo mayor en las CFU-E. En estadios posteriores, la expresión de EPOR decrece a medida que las células eritroides se diferencian y maduran. Los eritrocitos maduros no expresan receptores de EPO ([Testa, 2004](#)).

Las principales funciones de la EPO durante la eritropoyesis son ([Bottomley y Muller-Eberhard, 1988](#); [Hoffman y col., 1991](#); [Silva y col., 1996](#)):

- Inducir la transformación de CFU-E a proeritroblastos,
- Incrementar la capacidad mitótica de todos los precursores eritroides,
- Iniciar y mantener la maduración de los precursores eritroides mediante un estímulo constante de la hemoglobinogénesis,
- Mantener la viabilidad de los precursores eritroides inhibiendo la apoptosis celular.

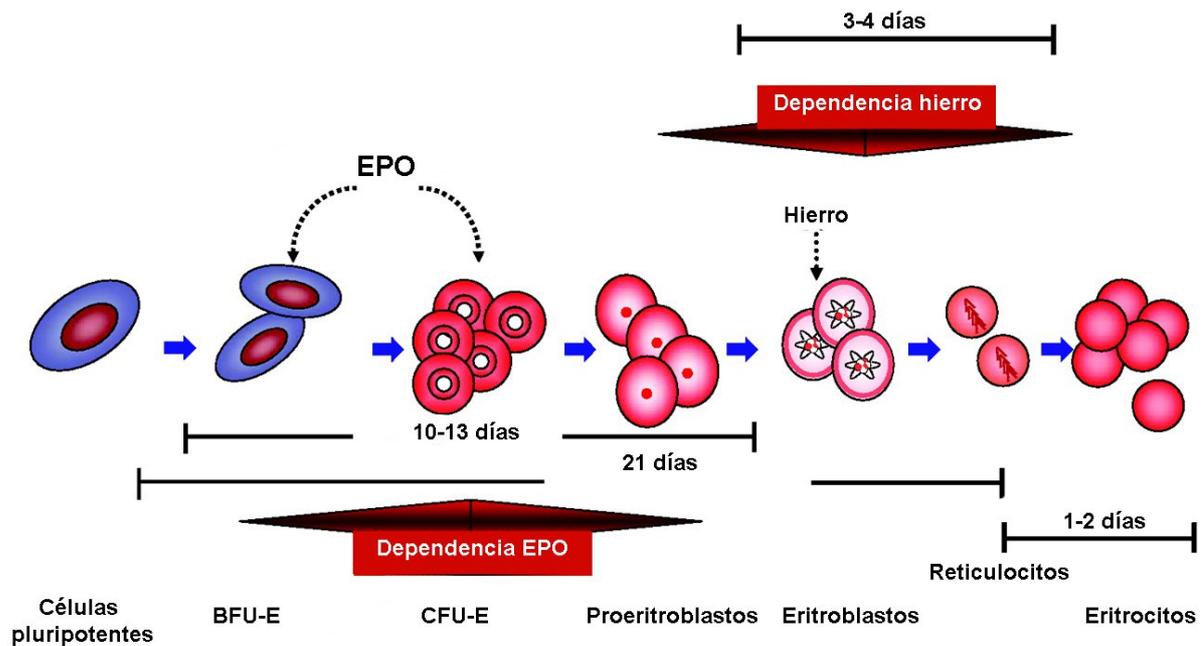


Fig. 8. Participación de la EPO en la eritropoyesis.

Adaptado de [Besarab y col. \(2009\)](#).

7.2 Acción citoprotectora

Como se mencionó anteriormente, la presencia ubicua de la dupla EPO/EPOR se asoció con el descubrimiento de nuevas funciones biológicas para la EPO en tejidos no hematopoyéticos.

En los últimos años, diversos estudios sugieren que la cascada de señalización activada por la unión de la EPO a su receptor en las células no eritroides, desencadenan una serie de eventos que contribuyen con la angiogénesis patológica y fisiológica, la inflamación, el desarrollo de ciertos tejidos y la restauración de los mismos luego de un daño, principalmente en cerebro y corazón.

En la actualidad los principales áreas de interés son la cardioprotección y la neuroprotección ([Chateauvieux y col., 2011](#)).

8. EPO Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

8.1 Expresión de EPO y EPOR en el cerebro

Los primeros hallazgos de la expresión de EPO en el cerebro se obtuvieron en estudios con roedores en el año 1992 ([Tan y col.](#)), y tiempo después se observó que el ARN mensajero (ARNm) de EPO era constitutivamente expresado en niveles comparables en el cerebro de ratón ([Digicaylioglu y col., 1995](#)), monos y humanos ([Marti y col., 1996](#)). Las regiones principales asociadas con esa expresión en cerebro de monos fueron corteza (frontal, temporal y occipital), cerebelo, hipotálamo,

hipocampo y núcleo caudado ([Digicaylioglu y col., 1995](#); [Marti y Bauer, 2006](#); [Marti y col., 1996](#)), mientras que en muestras de cerebro humano se observó dicha expresión en corteza, amígdala e hipocampo ([Marti y Bauer, 2006](#); [Marti y col., 1996](#); [Sirén y col., 2001](#)). Como proteína, la EPO fue encontrada en corteza e hipocampo en el cerebro de ratón y humano ([Bernaudin y col., 2000](#); [Sirén y col., 2001](#)). Además, la EPO fue detectada en líquido cefalorraquídeo (LCR) de adultos humanos ([Marti y col., 1997](#)) y neonatos ([Juul y col., 1997](#)).

En el ser humano las células encargadas de la producción de EPO en estas regiones son las neuronas y los astrocitos, siendo éstos últimos los principales productores ([Bernaudin y col., 2000](#); [Sirén y col., 2001](#)). En ratones, además de estos dos tipos celulares, también los oligodendrocitos fueron capaces de expresar EPO ([Masuda y col., 1994](#); [Sugawa y col., 2002](#)).

Una de las diferencias interesantes halladas entre la EPO producida por astrocitos de rata respecto a la EPO plasmática producida por células del riñón fue su menor masa molecular, aproximadamente 2 kDa menos, lo cual sugiere que existirían dos tipos de EPO en el mismo organismo con pequeñas diferencias que podrían estar asociadas a las modificaciones post-traduccionales sitio específicas tales como las ramificaciones de los carbohidratos y el contenido de ácido siálico terminal ([Masuda y col., 1994](#)).

En cuanto al receptor de EPO, se detectó en astrocitos y neuronas así como también en células de la microglía, oligodendrocitos y células del endotelio vascular ([Marti y Bauer, 2006](#); [Nagai y col., 2001](#)) (ver Fig. 9). En particular, los astrocitos ubicados alrededor de los capilares presentaron una fuerte expresión del receptor ([Brines y col., 2000](#)).

Estos hallazgos son compatibles con la idea de que las células neuronales, las células gliales y las células del endotelio vascular forman una red interactiva que promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos en el cerebro frente a situaciones de isquemia a fin de mantener el suministro de oxígeno y nutrientes ([Marti y Bauer, 2006](#)).

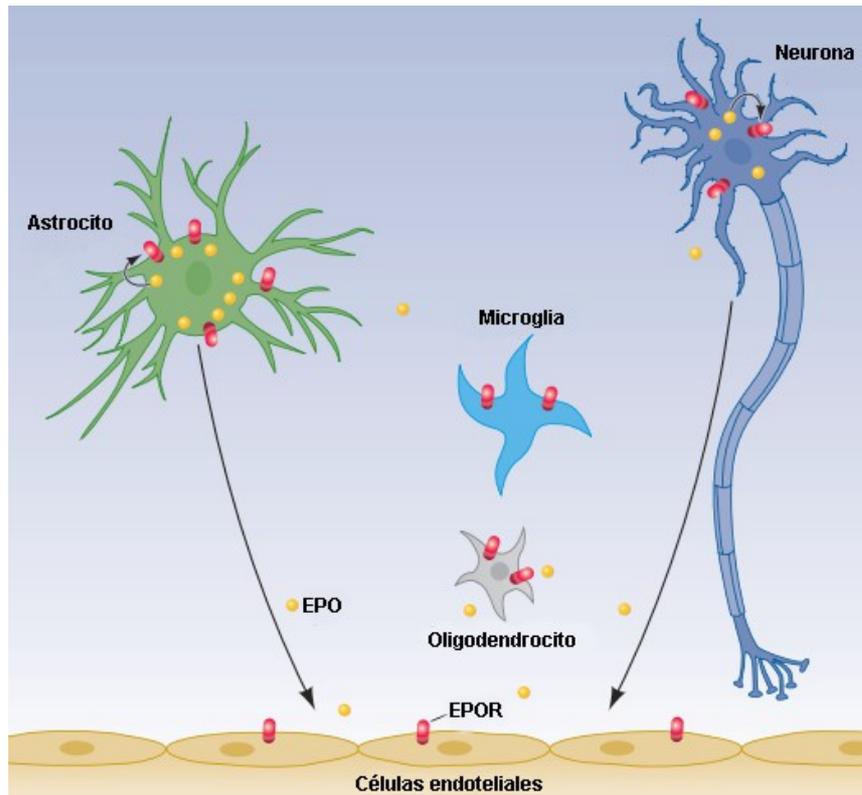


Fig. 9. Sitios de expresión de la EPO/EPOR en el cerebro

Mientras que la expresión de EPO sólo se ocurre en astrocitos y neuronas, la expresión del EPOR ocurre en astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, microglía y en la superficie de las células endoteliales. EPO actúa de forma autócrina y parácrina.

Adaptado de [Rabie y Marti \(2008\)](#).

8.2 Regulación de EPO y EPOR en el cerebro

De igual modo que en el tejido hematopoyético, en el cerebro la regulación de la expresión de la EPO está gobernada por los factores inducibles por hipoxia (HIFs) que son activados por una variedad de agentes que causan estrés cuyo mecanismo común es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como la disminución de la tensión de oxígeno ([Sirén y col., 2001](#)), hipoglucemia y toxicidad, entre otros ([Grasso y col., 2004](#)) así como también, en respuesta a la inflamación ([Nagai y col., 2001](#)).

Si bien en condiciones normales la expresión tanto de EPO como de su receptor es muy baja, es rápidamente inducible por dichos estímulos. Interesantemente, la expresión de EPO es potenciada en presencia del 17- β -estradiol, que por sí mismo es un neuroprotector ([Chikuma y col., 2000](#); [Sirén y Ehrenreich, 2001](#); [Wise y col., 2001](#)).

La mayoría de las células del SNC son extremadamente sensibles a cambios en la tensión de oxígeno. Por ejemplo, en condiciones de hipoxia aguda la mayoría de las neuronas incrementan marcadamente la expresión de EPO y su receptor ([Marti y](#)

[Bauer, 2006](#)). Esto se puso en evidencia en células neuronales del hipocampo tanto *in vitro* como *in vivo* ([Sirén y Ehrenreich, 2001](#)).

Por otro lado, se observó un aumento de la expresión del gen del EPOR en el cerebro luego de estrés anémico ([Chin y col., 2000](#)), así como en la zona próxima al área de infarto (zona de penumbra) luego de la oclusión de la arteria cerebral media ([Sadamoto y col., 1998](#)). A pesar que la EPO es el principal regulador de la expresión de su receptor en el tejido hematopoyético, en el cerebro está fundamentalmente regulado por la presencia de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF- α) ([Grasso y col., 2004](#)). Asimismo, estas citoquinas presentan un efecto positivo sobre la expresión de la EPO ([Nagai y col., 2001](#)).

8.3 Cascada de señalización de la EPO en el cerebro

Como se expuso anteriormente, la EPO se une a un homodímero conformado por dos subunidades del EPOR para cumplir su rol eritropoyético. Sin embargo, hay evidencias que postulan la existencia de otro receptor, además del clásico homodímero (EPOR)₂, involucrado en el rol citoprotector en algunos tejidos, como por ejemplo en el cerebro, que difiere del anterior en la afinidad por la EPO, la masa molecular del complejo y las proteínas asociadas al receptor ([Masuda y col., 1993](#)). Esto sugiere que ambos efectos serían actividades totalmente independientes una de la otra.

En 1997 se descubrió que existía interacción entre el EPOR y la subunidad β -común (β cR), que es el componente encargado de la transducción de señal común en los receptores para GM-CSF, IL-3 e IL-5 ([Jubinsky y col., 1997](#)). Con este hallazgo nace la hipótesis de que el efecto neuroprotector de la EPO estaría mediado por su unión a un heteroreceptor, hecho que fue demostrado por [Brines y col. \(2004\)](#).

Teniendo en cuenta que β cR existe como un dímero entrelazado sobre la superficie celular ([Carr y col., 2001](#)) y que se une a la subunidad α de forma covalente recién cuando ésta se une a su ligando, se propuso que el receptor involucrado en la citoprotección en este tejido es un heterómero formado por una subunidad del EPOR unida a cada lado de un homodímero de β cR ([Brines y Cerami, 2008](#)) (Fig. 10).

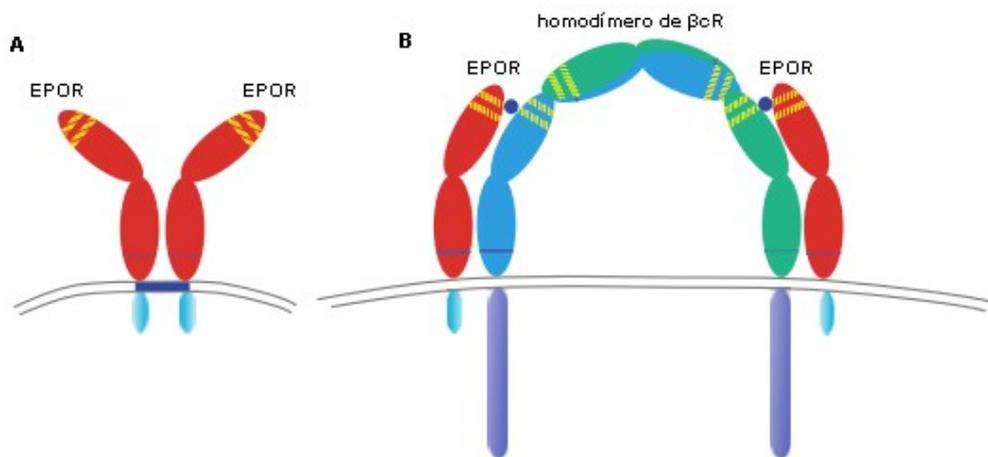


Fig. 10. Isoformas del receptor de EPO.

- A. Clásico homodímero de EPOR, fundamentalmente participa en la eritropoyesis.
- B. Modelo propuesto para el receptor involucrado en la citoprotección basado en el conocimiento de GM-CSF y otros miembros de la familia de citoquinas de tipo I. El mismo consiste en un homodímero de cadenas βcR entrelazadas antiparalelas y un monómero de EPOR asociado a cada subunidad βcR a través de las uniones de cisteínas. En amarillo se indican los residuos de cisteínas y en azul se representan los motivos Trp-Ser. Adaptado de [Brines y Cerami \(2008\)](#).

La activación de este receptor heteromérico requiere altas concentraciones de EPO debido a que la afinidad a EPO es menor que la afinidad del receptor homodimérico ([Konstantinopoulos y col., 2007](#)).

Si bien se plantea a este receptor como el protagonista en el rol citoprotector, existe evidencia de que, cuando la expresión del βcR es muy baja o nula, el homodímero de EPOR podría disparar también la citoprotección ([Um y col., 2007](#)).

La interacción entre los dominios intracelulares de las subunidades del homodímero o el heterómero conduce a la activación de múltiples vías de señalización con la consecuente activación de la transcripción de numerosos genes asociados con un efecto antiapoptótico y mitogénico. Las cascadas de señalización JAKs/STAT5, Ras/MAPK y PI-3K/Akt y la activación del NF- κ B, que están involucradas en la eritropoyesis también están implicadas en la citoprotección (Fig. 7).

8.4 Funciones de la EPO en el cerebro

El sistema endógeno EPO/EPOR es esencial para el desarrollo neuronal del embrión en estadios tempranos y contribuye a la supervivencia neuronal y

neurogénesis en adultos. A continuación se presenta el rol de dicho sistema en cada una de estas funciones.

8.4.1 Durante el desarrollo

EPO y EPOR son detectados durante el desarrollo temprano del embrión hasta la mitad de la gestación. Su expresión en el sistema nervioso central puede evidenciarse durante el desarrollo fetal humano alrededor de la semana 7 con un incremento entre la semana 8-24 y luego disminuye marcadamente en el momento del nacimiento ([Juul y col., 1998](#)). Sin embargo, en el LCR persiste durante toda la vida y se incrementa en condiciones de hipoxia.

Este comportamiento también fue advertido por Liu y colaboradores en estudios con ratones, donde observaron que la expresión del EPOR en el cerebro disminuía alrededor de 1000 veces justo antes del nacimiento ([Liu y col., 1997](#)).

Con el fin de comprender esa fluctuación, Juul y su equipo examinaron los cambios de los niveles de los mismos durante el desarrollo y hallaron que a partir de la semana 5-6 hay una marcada presencia de EPO y su receptor en las células neuroepiteliales indiferenciadas de la zona periventricular, y alrededor de la semana 10 la expresión de EPOR es predominante en la zona subventricular que contiene las células nerviosas multipotentes (futuros oligodendrocitos y astrocitos). La progresión de la neurodiferenciación es acompañada por la predominancia de EPO en astrocitos y del receptor en neuronas. En conjunto, esta información sugiere la existencia de funciones neurotróficas de EPO durante el desarrollo.

El trabajo con ratones transgénicos a los cuales los genes de EPO y EPOR habían sido suprimidos sumó datos al estudio de la función del sistema EPO/EPOR durante el desarrollo fetal, ya que se observó que los animales murieron prematuramente en el útero entre el día 11 y 15 de su etapa gestacional (E11-E15) debido a anemias severas ([Kieran y col., 1996](#); [Lin y col., 1996](#); [Wu y col., 1995](#)) y a lesiones en el cerebro tales como cierre incompleto del tubo neural ([Tsai y col., 2006](#)). En la misma línea, ratones a los cuales sólo se les suprimió el gen del EPOR presentaron incrementada apoptosis en el hígado, corazón y cerebro ([Yu y col., 2001](#); [Yu y col., 2002](#)).

Consistentemente con esto, la delección del gen que codifica para el EPOR específico del cerebro resultó en la reducción de la proliferación celular en la zona subventricular, donde la neurogénesis tiene lugar en los ratones adultos, y perjudicó la neurogénesis post-accidente cerebro vascular (ACV) a través de una migración deficiente de las células progenitoras neuronales hacia los alrededores de la zona del infarto ([Tsai y col., 2006](#)).

Todas estas evidencias sugieren que el sistema EPO/EPOR juega un papel importante en el desarrollo del cerebro. Este rol clave probablemente esté asociado con la capacidad de la EPO para estimular la diferenciación y la prevención de la apoptosis de las células progenitoras neuronales en el cerebro embrionario ([Shingo y col., 2001](#); [Studer y col., 2000](#); [Yu y col., 2001](#); [Yu y col., 2002](#)).

8.4.2 Neuroprotección

La neuroprotección es una estrategia terapéutica destinada a evitar, retardar o detener la progresión de la pérdida neuronal, preservando y restaurando las interacciones celulares en el cerebro, con el objeto de maximizar la protección de las funciones neuronales en enfermedades del sistema nervioso central de orígenes diversos tales como ACVs, neurotrauma, neuroinflamación y neurodegeneración ([Nordqvist, 2006](#)).

En este campo, la EPO ha despertado un particular interés a partir de las evidencias sobre su capacidad para inducir un amplio rango de respuestas celulares en el cerebro directamente relacionadas con la protección y la reparación del daño. Los mecanismos por los cuales la EPO puede inducir neuroprotección son complejos y variados, dentro de los más importantes podemos encontrar mecanismos antiinflamatorios, antioxidantes, antineurotóxicos, angiogénicos, neurotróficos, regenerativos y, uno de los principales, capacidad para prevenir la apoptosis.

8.4.2.1 Propiedades antiapoptóticas

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis, así como su renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia. Esta muerte es de vital importancia, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la vida adulta ([de la Rosa y col., 2000](#); [Glucksmann, 1951](#); [Jacobson y col., 1997](#); [Kerr y col., 1972](#); [Raff, 1992](#)).

Cuando este equilibrio se rompe, ocurre un desbalance en el organismo que puede generar la inhibición de la apoptosis o el incremento de la misma. En general, en la mayoría de las enfermedades del sistema nervioso central ocurre un incremento de esta muerte celular programada.

Un gran número de estudios *in vitro* con diversas líneas celulares o cultivos primarios de células neuronales, así como ensayos *in vivo* empleando ratones, ratas, gerbos y conejos, han demostrado un marcado rol antiapoptótico por parte de la EPO ([Ghezzi y Brines, 2004](#); [Sargin y col., 2010](#); [Sosa y col., 2008](#)).

Uno de los mecanismos más estudiados involucrados en esta función de la EPO es la modulación de los genes de la familia Bcl-2. Esta familia de genes cumple un rol crucial en la regulación de la apoptosis a través de su capacidad para regular la liberación del citocromo c mitocondrial. Pueden ser divididos en tres subclases, definidas, en parte, por los dominios presentes en cada una de ellas (BH 1-4 y/o TM). Dentro de estas subclases se encuentran los que promueven la muerte o los que la inhiben. Por lo tanto, actúan como un reóstato dado que cuando el equilibrio se rompe, la célula muere o sobrevive (Fig.11).

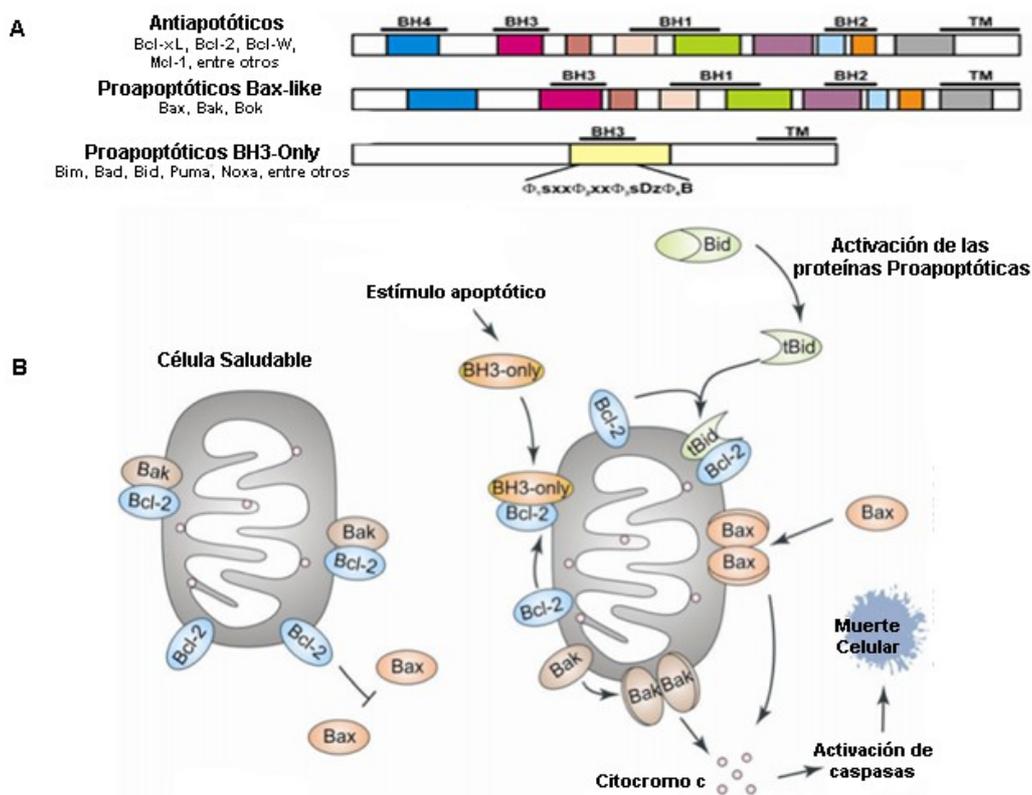


Fig. 11. Rol de la familia Bcl-2 en la regulación de la apoptosis.

- A.** Grupos de las proteínas de la familia Bcl-2, basadas en sus dominios y función.
- B.** Diferencias entre una célula saludable y una célula que ingresa en apoptosis. Balance entre las proteínas pro y antiapoptóticas. Adaptado de [Rautureau y col. \(2010\)](#).

La EPO ha mostrado una consistente participación en el incremento de la expresión del gen antiapoptótico Bcl-X_L, en la disminución del gen Bak y también en el cambio de la relación Bcl-2/Bax hacia un efecto antiapoptótico en un gran número de líneas celulares y cultivos primarios, preservando la supervivencia celular ([Ghezzi y Brines, 2004](#); [Sifringer y col., 2012](#); [van der Kooij y col., 2008](#)). Asimismo, en un gran

número de modelos de daño neuronal *in vivo*, tales como enfermedades cerebrovasculares, hemorragia cerebral, enfermedades neurodegenerativas y daño traumático, la administración de EPO exógena mostró efecto antiapoptótico regulando la expresión de los genes y la expresión de las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, preservando el potencial de membrana mitocondrial e inhibiendo la activación de las caspasas ([Sargin y col., 2010](#); [Sifringer y col., 2012](#); [Xiong y col., 2009](#)).

Otra de las proteínas involucradas en esta función es el NF- κ B que, como se expuso anteriormente, es activada tras la unión de la EPO a su receptor y existen evidencias que activa la expresión de la familia de proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAPs), las cuales inhiben la activación de las caspasas 3, 8 y 9. Además, el NF- κ B podría activar la expresión de Bcl-X_L ([Digicaylioglu, 2006](#)).

8.4.2.2 Efecto antiinflamatorio

El SNC posee células inflamatorias innatas como la microglía y los macrófagos, las cuales tienen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias. Recientemente se ha postulado que el sistema inmune y el proceso inflamatorio participan de forma activa en la pérdida neuronal descrita en enfermedades del SNC agudas (infarto cerebral) y crónicas (esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer) ([Cuenca-lópez y col., 2010](#)).

La respuesta inflamatoria en el SNC se caracteriza por la activación de la microglía y astrocitos, y por la expresión de mediadores inflamatorios claves, con una limitada invasión de células inflamatorias circulantes. Este hecho puede verse aumentado por la inducción rápida de la expresión de mediadores inflamatorios, como las citoquinas, quimioquinas y prostaglandinas, que sobrerregulan las moléculas de adhesión y aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), facilitando la invasión de células inflamatorias circulantes, con la consecuente liberación de moléculas potencialmente tóxicas para las neuronas ([Cuenca-lópez y col., 2010](#); [Kaur y Ling, 2008](#)).

En la última década, un importante número de experimentos *in vivo* han demostrado que la EPO presenta efecto antiinflamatorio. En modelos de isquemia cerebral, donde la inflamación juega un rol crítico en la patogénesis, la administración exógena de rhEPO redujo notablemente la migración de células inflamatorias al tejido isquémico, atenuando la producción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 y 6, limitando el tamaño de la lesión ([Alnaeeli y col., 2012](#); [Sifringer y col., 2012](#); [Sosa y col., 2008](#); [Villa y col., 2003](#)).

Por otra parte, en muchos modelos de esclerosis múltiple y malaria cerebral la administración de rhEPO inhibió la respuesta inflamatoria, retrasando la aparición de la enfermedad y disminuyendo su severidad. También se observó un incremento de la supervivencia celular y una menor desmielinización e injuria axonal ([Agnello y col., 2002](#); [Sargin y col., 2010](#); [Savino y col., 2006](#); [Yuan y col., 2008](#); [Zhang y col., 2005](#)).

8.4.2.3 Efecto antioxidante

El estrés oxidativo está involucrado como un mediador crucial en la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas ([Halliwell, 2006](#); [Mariani y col., 2005](#)) y ocurre como el resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno que consisten en radicales libres de oxígeno y otras entidades químicas. Estas entidades químicas pueden involucrar radicales libres superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno single, óxido nítrico (NO) y peroxinitrito. La mayoría de estas especies son producidas a bajos niveles durante condiciones fisiológicas normales y son eliminadas de la célula mediante el sistema antioxidante endógeno que incluye la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa y moléculas pequeñas como las vitaminas C y E ([Maiese y col., 2008](#)).

Existen evidencias de que el tratamiento con EPO protege de la muerte neuronal inducida por agentes generadores de NO ([Olsen, 2003](#); [Sakanaka y col., 1998](#)) e inhibe la peroxidación lipídica mediante el incremento de la actividad de las enzimas citosólicas antioxidantes tal como la GPX ([Chattopadhyay y col., 2000](#); [Kumral y col., 2005a](#); [Kumral y col., 2005b](#); [Solaroglu y col., 2003](#)) así como también estimulando la producción de GPX en cultivo de astrocitos ([Genc y col., 2002](#)), protegiendo a la microglia de la muerte inducida por estrés oxidativo ([Li y col., 2006](#)) y restaurando la función mitocondrial luego de un daño traumático cerebral ([Sifringer y col., 2012](#); [Xiong y col., 2009](#)).

8.4.2.4 Propiedades neurotróficas y regeneración neuronal

La EPO ha reportado un efecto neurotrófico y neuroregenerativo que se ha puesto en evidencia mediante distintos aspectos que incluyen la capacidad de estimular la formación de neuritas, la regeneración axonal, la brotación dendrítica y la actividad eléctrica, así como la capacidad de modular el calcio intracelular y la síntesis y liberación de neurotransmisores ([Sifringer y col., 2012](#)).

Por otra parte, se ha demostrado que la EPO activa la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un cultivo primario de neuronas hipocampales y reduce la apoptosis inducida por una neurotoxina en dicho cultivo. Por

lo tanto, esto indicaría que la activación de este factor contribuiría a su rol neuroprotector ([Viviani y col., 2005](#)).

Además, la EPO evidenció en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas tales como epilepsia, Parkinson, degeneración retinal, neuropatías, injuria en el nervio ciático, esclerosis lateral amiotrófica entre otras, un mejoramiento funcional, disminución de la apoptosis, de la inflamación, de la desmielinización y de la degeneración axonal, así como un mejoramiento y prolongación de la supervivencia ([Sargin y col., 2010](#)). Además, la EPO produjo un mejoramiento funcional a través de la modulación de la plasticidad, de la conectividad sináptica y de la actividad neuronal relacionada con la memoria ([Adamcio y col., 2008](#); [Weber y col., 2002](#)).

Como se expuso anteriormente (apartado 9.4.1), la EPO tiene efecto sobre la neurogénesis durante el desarrollo. Sin embargo, este efecto no se limita sólo a esta etapa sino que también contribuye a los procesos de reparación del cerebro luego de un daño tanto *in vitro* como *in vivo* ([Shingo y col., 2001](#)).

También se observó que la EPO es capaz de promover la diferenciación de las células multipotentes a astrocitos y oligodendrocitos, este efecto estaría asociado a la activación del NF- κ B ([Lee y col., 2004](#); [Sugawa y col., 2002](#)).

Por último, también se encontró que la EPO induce la elongación de las neuritas y, de este modo, mejora y modula el efecto regenerativo en neuronas del ganglio espiral ([Berkingali y col., 2008](#)).

8.4.2.5 Potencial angiogénico

La angiogénesis es un proceso que involucra múltiples pasos, altamente controlado, mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente.

Varios estudios han evidenciado un rol angiogénico por parte de la EPO que podría actuar como un nivel adicional de citoprotección en varios sistemas celulares y tejidos ([Rabie y Marti, 2008](#)). Por ejemplo, en un modelo de isquemia cerebral se puso en evidencia que la EPO promueve la expresión de factores angiogénicos como por ejemplo VEGF, Tie-2 y angiopoyetina-2, los cuales podrían colaborar con la restauración del flujo sanguíneo a los niveles normales ([Li y col., 2007a](#)). Por otro lado, en cultivos de células endoteliales se observó que la EPO además regulaba la expresión de otros genes involucrados en la función vascular, transducción de señales y transferencia de energía ([Banerjee y col., 2000](#); [Carlini y col., 1995](#); [Fodinger y col., 2000](#); [Sifringer y col., 2012](#); [Wang y Vaziri, 1999](#)).

Este efecto, fue finalmente confirmado empleando ratones genéticamente modificados que no expresaban EPO ni su receptor, donde los embriones sufrieron severos defectos en la angiogénesis ([Kertesz y col., 2004](#)).

Adicionalmente, la EPO también está involucrada en la regulación de la permeabilidad vascular y la estabilización de la BHE ([Martinez-Estrada y col., 2003](#); [Noguchi y col., 2007](#); [Uzum y col., 2006](#)).

En conclusión, en el sistema vascular, la EPO no sólo actúa directamente preservando la integridad de las células endoteliales sino también promueve la angiogénesis ([Chong y col., 2002](#); [Ribatti y col., 2003](#)) y protege la BHE, contribuyendo todo esto con el efecto citoprotector.

8.4.2.6 Propiedades antineurotóxicas

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro y participa en la patogénesis de diversas enfermedades neurológicas asociadas con la pérdida neuronal.

Cuando la concentración de glutamato se eleva en condiciones de hipoxia o hiperglucemia genera un incremento en la producción de NO, el que luego reacciona con superóxidos y forma peroxinitrito e induce la muerte neuronal ([Morishita y col., 1997](#); [Nicotera y Lipton, 1999](#)). La EPO protege al cerebro de la toxicidad inducida por glutamato a través de la vías JAK-2/STAT y PI3K/Akt ([Byts y col., 2008](#)). Otro de los mecanismos moleculares propuestos podría estar relacionado con la modulación inducida por EPO del flujo de calcio intracelular inducido por glutamato ([Morishita y col., 1997](#)), pero esto aún no está claramente establecido. Ensayos recientes con cultivo de células corticales sugieren que la EPO disminuye la entrada de calcio en condiciones de excitotoxicidad, en parte a través de la activación de los canales K activados por calcio, cuya activación depende de la vía PI3K ([Andoh y col., 2011](#)).

Por lo tanto, la disminución de la entrada de calcio podría contribuir con efecto neuroprotector de la EPO.

8.5 EPO como un agente neuroterapéutico en enfermedades del sistema nervioso central

Todas las evidencias obtenidas en ensayos *in vitro* e *in vivo*, postulan a la EPO como un excelente candidato para el tratamiento de enfermedades del SNC, ya que cumple con algunas de las propiedades que debe reunir un agente neuroprotector ideal debido a que presenta mecanismos múltiples de acción, es bien tolerado en humanos, no es neurotóxico y no interacciona con otros neuroprotectores. Sin embargo, hay que considerar ciertos aspectos antes de pensar en una aplicación

futura de la rhEPO como un neuroprotector en la clínica, tales como accesibilidad al tejido cerebral y riesgos asociados a su aplicación.

8.5.1 Traspaso de la BHE

La BHE es una barrera que existe entre los [capilares sanguíneos](#) y el [sistema nervioso central](#). Su principal función es mantener las concentraciones vasculares y extravasculares de iones y moléculas en niveles apropiados en estos dos compartimientos. Es decir, impedir que muchas sustancias tóxicas la atraviesen, permitiendo al mismo tiempo el pasaje de nutrientes y [oxígeno](#). Está conformada por células endoteliales estrechamente unidas rodeadas por astrocitos y, en las arteriolas, el espacio pericapilar entre el endotelio y los pies gliales presenta pericitos ([Pascual Garvi y col., 2004](#)).

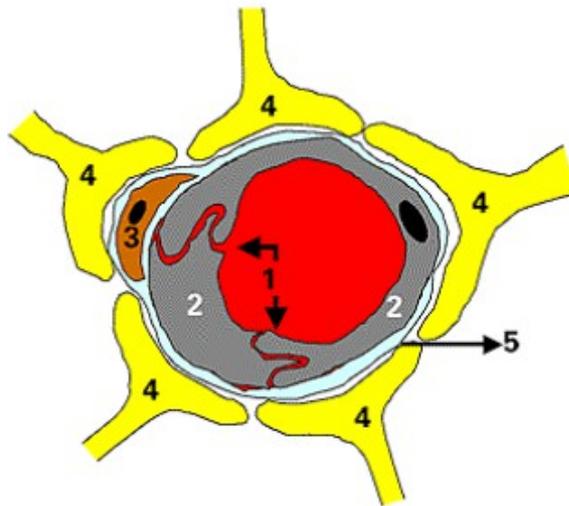


Fig. 12. Esquema de la estructura de la pared de un capilar con BHE.

1. Uniones estrechas entre dos células endoteliales; 2. Célula endotelial; 3. Pericito; 4. Pie astrocitario pericapilar; 5. Lámina basal subendotelial; 6. Hendidura interendotelial 7. Fenestración intraendotelial. Adaptado de [Pascual Garvi y col. \(2004\)](#).

La BHE es la principal barrera para el transporte de medicamentos en el cerebro. El transporte de sustancias a este tejido depende de los mecanismos de transporte presentes en la misma y la difusión depende también de las características fisicoquímicas de la molécula ([Pascual Garvi y col., 2004](#)). Por lo tanto, es de gran importancia determinar si un compuesto candidato para la neuroprotección es capaz o no de travesar dicha barrera.

En cuanto a la EPO, inicialmente varios estudios indicaban que la hormona endógena producida por el riñón no era capaz de atravesar la BHE, excepto que esta

perdiera su integridad, por lo que se pensaba que esto se debía a su tamaño y nivel de glicosilación ([Buemi y col., 2000](#); [Digicaylioglu y col., 1995](#); [Marti y col., 1997](#)). Sin embargo, tiempo después se halló que luego de una administración sistémica de EPO en distintos animales, tales como ratones, ovejas, conejos y monos, la misma era detectada en LCR luego de 1-2 h posteriores a su aplicación endovenosa ([Brines y Cerami, 2008](#); [Brines y col., 2000](#); [Ehrenreich y col., 2004](#); [Erbayraktar y col., 2003](#); [Juul y col., 2004](#); [Statler y col., 2007a](#)).

Debido a que estudios inmunohistoquímicos demostraron alta presencia del EPOR en la zona que rodeaba a los capilares sanguíneos, especialmente entre los pies astrocíticos y la cara luminal de las células endoteliales, se sugirió que la EPO circulante podría unirse a estos receptores y podría ser transportada en forma específica y saturable por transcitososis desde el lumen capilar hacia el parénquima cerebral, como ocurre con otras citoquinas ([Brines y col., 2000](#)). Sin embargo, aún no está claro qué mecanismos emplea ya que otros autores postulan que este transporte se realiza en forma lenta a través de una vía extracelular no específica ([Banks y col., 2004](#)). Por lo tanto, hacen falta más estudios para poder dilucidar el movimiento de EPO hacia el parénquima cerebral.

Dado que la transferencia de EPO desde la sangre al LCR es muy baja, no superando el 0,1% de la dosis inyectada, se requieren altas dosis de administración para alcanzar concentraciones apropiadas para que cumplan su función citoprotectora ([Brines y col., 2000](#); [Ehrenreich y col., 2004](#); [Erbayraktar y col., 2003](#); [Juul y col., 2004](#); [Statler y col., 2007a](#); [Xenocostas y col., 2005](#)).

8.5.2 Riesgos asociados con su aplicación

El uso de la EPO como un agente neuroprotector para el tratamiento de enfermedades del SNC en humanos requiere un manejo meticuloso y comprensivo, particularmente porque altas dosis de EPO son requeridas para obtener niveles suficientes de dicha hormona en el cerebro en situaciones en las que la BHE está intacta.

Dado que este agente debe aplicarse en forma sistemática en algunas enfermedades como, por ejemplo, neurodegenerativas, debe considerarse la aparición de efectos indeseados asociados con la capacidad hematopoyética de dicha molécula tales como elevación de la masa de glóbulos rojos, hipertensión y trombosis ([Stohlawetz y col., 2000](#); [Wiessner y col., 2001](#)), que a su vez pueden comprometer la actividad neuroprotectora y endotelial de la EPO ([Noguchi y col., 2007](#)).

Por lo tanto, es sumamente importante el desarrollo de análogos de EPO que modulen selectivamente el rol hormonal y autócrino/parácrino de la misma ([Konstantinopoulos y col., 2007](#)).

8.5.3 Estrategias para la obtención de nuevos derivados.

Para contrarrestar los efectos adversos del uso de elevadas dosis de rhEPO, se han diseñado diversas estrategias con el fin de modificar dicha molécula para que mantenga su actividad neuroprotectora pero su capacidad hematopoyética sea nula. Dentro de las principales alternativas empleadas con esta finalidad se encuentran las modificaciones químicas y la manipulación del contenido de ácido siálico.

8.5.3.1 Modificación química

Teniendo en cuenta que la función hormonal y la autócrina/parácrina de la EPO podrían estar gobernadas por dos receptores distintos con actividades no superpuestas, se planteó la posibilidad de disparar estas actividades selectivamente mediante una modulación apropiada de estos receptores. Para ello, se pensó en modificaciones que permitieran evitar el efecto hematopoyético.

Existen muchas posibilidades de modificar químicamente la EPO. Diversos residuos aminoacídicos de la proteína tales como lisinas, argininas, tirosinas y grupos carboxilo pueden ser modificados mediante carbamilación, amidación, trinitrofenilación o acetilación.

Particularmente para la EPO, hasta el momento se ha evaluado la carbamilación de siete residuos de lisina, lo que genera residuos de homocitrulina ([Leist y col., 2004](#)). Este mecanismo ocurre en forma parcial naturalmente en el cuerpo humano ya que 0,8 % de la urea es convertida a cianato en el plasma humano. Éste, a su vez, reacciona con la EPO ([Satake y col., 1990](#)) para obtener una EPO parcialmente carbamylada ([Mun y Golper, 2000](#)). Esta metodología conlleva cambios conformacionales en la proteína que afectan su función.

Sobre la base de este hecho, se realizó la carbamilación completa de la EPO y se obtuvo una nueva molécula denominada CEPO que no presenta actividad hematopoyética pero sí retiene la actividad citoprotectora tanto *in vitro* como *in vivo* ([Leist y col., 2004](#); [Mennini y col., 2006](#); [Siren y col., 2009](#)).

8.5.3.2 Modificación del contenido de ácido siálico

Esta estrategia tiene como fundamento la propiedad de los carbohidratos y el ácido siálico terminal de modular la farmacocinética y la velocidad de depuración de las proteínas ([Sinclair y Elliott, 2005](#)).

Para el caso particular de la EPO, como se detalló anteriormente, el contenido de ácido siálico en la molécula es crucial para su efecto eritropoyético.

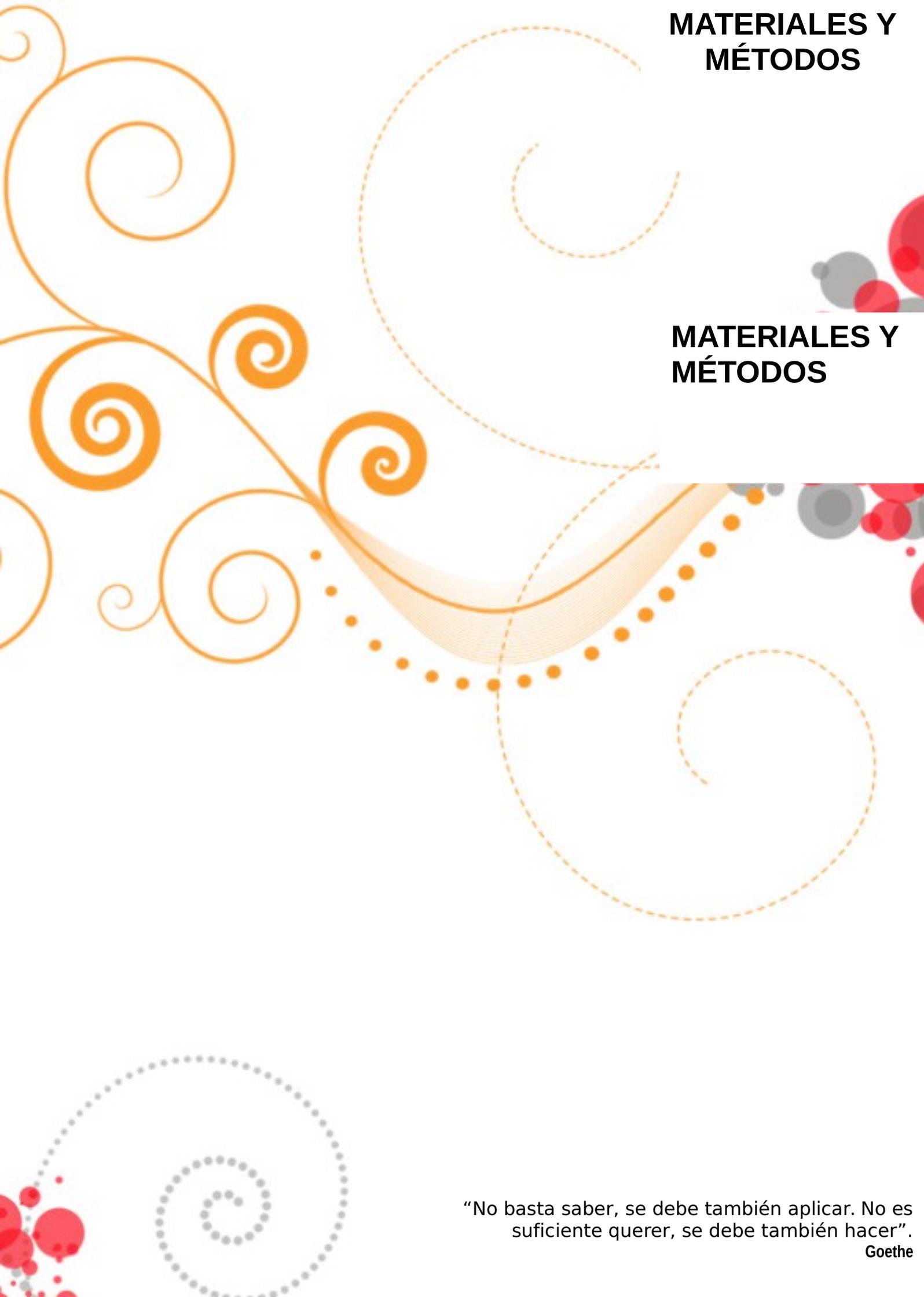
Teniendo en cuenta esto, una alternativa que ha demostrado ser exitosa consiste en la remoción completa de todos los residuos de ácido siálico de la rhEPO generando una molécula completamente desializada denominada AsialoEPO (rhAEPO), caracterizada por presentar una alta afinidad por el receptor en cultivos *in vitro* ([Imai y col., 1990](#)) pero casi nula actividad eritropoyética *in vivo* ([Erbayraktar y col., 2003](#)) debido a su corta vida media plasmática (~ 1,4 min). No obstante, ejerció un efecto neuroprotector comparable al de la rhEPO en ensayos desarrollados *in vivo* e *in vitro* ([Erbayraktar y col., 2003](#)). Este hallazgo refleja que la respuesta eritropoyética requiere la presencia continua de la hormona mientras que la acción citoprotectora necesita una exposición breve pero con altas dosis.

Otra variante obtenida mediante esta estrategia es la denominada Neuro-EPO que presenta entre 4 y 7 mol AS.(mol de proteína)⁻¹, representando aproximadamente el 40% de AS correspondiente a la hormona hematopoyética. En bibliografía no se hallaron datos publicados acerca del proceso de purificación empleado para su obtención ni de sus características citoprotectoras en modelos *in vitro* pero si existen evidencias de su acción neuroprotectora en modelos de isquemia cerebral focal en gerbos y ratas tras su aplicación intranasal. Sin embargo, no existen reportes de su utilización por vía sistémica ([Nuñez Figueredo y col., 2009](#); [Teste y col., 2012](#)).

OBJETIVOS Y PLAN DE TESIS

El presente trabajo de tesis se centra en la obtención de una nueva variante de rhEPO que mantenga la capacidad neuroprotectora de la rhEPO pero que demuestre menor actividad hematopoyética, con el fin de que pueda ser administrada por vía sistémica en el tratamiento de diversas enfermedades cerebrovasculares y del SNC, disminuyendo la aparición de efectos colaterales indeseados. Con ese fin, basándose en la estrategia de la modificación del contenido de ácido siálico terminal, se propusieron los siguientes objetivos particulares:

1. Preparación de una nueva variante mediante la selección de las isoformas menos ácidas de rhEPO, es decir, las que presentan un bajo contenido de ácido siálico terminal.
2. Caracterización fisicoquímica de dicha combinación de glicofomas de rhEPO.
3. Evaluación de la actividad biológica hematopoyética *in vitro* e *in vivo*.
4. Evaluación de la actividad biológica neuroprotectora en cultivo de células con características neuronales, SH-SY5Y y PC-12.
5. Evaluación de la actividad antiapoptótica en líneas celulares establecidas con características neuronales, SH-SY5Y y PC-12 y en cultivos primarios de neuronas corticales.
6. Análisis farmacocinético de las diferentes combinaciones de isoformas de rhEPO en plasma.
7. Análisis de la localización y traspaso de la BHE de las diferentes combinaciones de isoformas de rhEPO.
8. Permeabilización de la BHE empleando manitol y evaluación de su efecto sobre el traspaso de las variantes del rhEPO.
9. Evaluación de la actividad neuroprotectora en un modelo de isquemia cerebral focal producida por la oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO).



**MATERIALES Y
MÉTODOS**

**MATERIALES Y
MÉTODOS**

“No basta saber, se debe también aplicar. No es
suficiente querer, se debe también hacer”.

Goethe

MATERIALES Y MÉTODOS

1 REACTIVOS Y SOLUCIONES

Excepto en los casos donde se aclara expresamente, todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultra pura obtenida por ósmosis inversa (resistividad 18,2 MΩ.cm) y filtración (0,22 μm), empleando un equipo Milli QUF (Millipore, Francia). Todos los reactivos fueron de grado de pureza analítico.

9. LINEAS CELULARES

A continuación se detallan las líneas celulares de mamífero empleadas durante el desarrollo del trabajo, así como su procedencia, características y utilidad:

- **Clon productor de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO-CHO.K1):** puesto a disposición en el Laboratorio de Cultivos Celulares por la empresa Zelltek S.A. (Santa Fe, Santa Fe, Argentina). Este clon se obtuvo transfectando la línea CHO.K1 [*American Type Culture Collection* (ATCC), EE.UU] con un plásmido que contenía el gen de la eritropoyetina humana y empleando la técnica de clonado por dilución límite. El mismo secreta una proteína con características de masa molecular, patrón de glicosilación y distribución de isoformas compatibles para su uso en la producción del medicamento ([Amadeo y col., 1998](#)).
- **UT-7 ([Drexler y col., 1997](#); [Komatsu y col., 1991](#)):** obtenida de la colección de cultivos del *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ; Braunschweig, Alemania). Esta línea se estableció a partir de células de la médula ósea de un paciente con leucemia mieloide. Son células constitutivamente dependientes de citoquinas y responden a varias de ellas.
- **UT-7/EPO:** esta línea se obtuvo en el laboratorio a partir de la línea celular UT-7 luego de adaptarlas durante 5 meses al crecimiento sólo en presencia de eritropoyetina humana recombinante partiendo del conocimiento de que si bien la línea celular UT-7 crece en forma dependiente de la citoquina IL-3 y GM-CSF, también expresa receptores

de EPO ([Komatsu y col., 1993](#)). Se empleó para la valoración de la actividad biológica *in vitro* de las variantes de rhEPO.

- **TF-1** ([Drexler y col., 1997](#); [Kitamura y col., 1989](#)): obtenida de la colección de cultivos del *DSMZ*.

Esta línea fue establecida a partir de células de la médula ósea de un paciente con eritroleucemia. Se caracteriza por presentar un crecimiento absolutamente dependiente de uno de los tres factores de crecimiento hematopoyético: EPO, GM-CSF e IL-3.

Se empleó para la valoración de la actividad biológica *in vitro* de las variantes de rhEPO.

- **PC-12** ([Greene y Tischler, 1976](#)): obtenida de la colección de cultivos del *Cell Line Services*, (LCC, Eppelheim, Alemania).

Esta línea se estableció a partir de un feocromocitoma de rata. Se caracteriza por responder al factor de crecimiento nervioso (NGF) y tiene la capacidad de sintetizar y almacenar catecolaminas.

Se empleó para la evaluación del efecto neuroprotector y antiapoptótico *in vitro* de las variantes de rhEPO.

- **SH-SY5Y** ([Biedler y col., 1978](#)): obtenida de la colección de cultivos ATCC.

Esta línea celular se obtuvo a partir de tres subclonados consecutivos de la línea SK-N-SH ([Biedler y col., 1973](#)) la cual fue obtenida a partir de un neuroblastoma metastásico humano.

El primer subclon se llamó SH-SY, el cual fue nuevamente subclonado como SH-SY5 y finalmente éste, fue subclonado nuevamente como SH-SY5Y. A diferencia de la línea celular que le dio origen, ésta presenta receptores para eritropoyetina mientras que la progenitora no ([Sartelet y col., 2007](#)). Por tal motivo, se empleó para la evaluación del efecto neuroprotector y antiapoptótico *in vitro* de las variantes de rhEPO.

10. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES

Para la obtención de cultivos primarios de neuronas corticales se emplearon ratas Wistar de 1 día de edad, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina (UBA, Buenos Aires). Las mismas fueron sacrificadas mediante decapitación en condiciones

asépticas, que se mantuvieron hasta el final del proceso. Posteriormente, el cerebro fue retirado cuidadosamente del cráneo y se colocó en una placa de Petri conteniendo solución fisiológica (B/Braun Medical S.A., Argentina).

El tejido, debidamente enjuagado con solución fisiológica, fue manipulado con sumo cuidado y se retiraron las cortezas cerebrales disecando las meninges. Una vez obtenidas las cortezas limpias se trasvasaron a otra placa de Petri, en la cual se disgregó el tejido mecánicamente con un bisturí estéril y se adicionó la solución de disociación [Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco, EE.UU) suplementado con Papaína (Sigma) 4 UI.ml⁻¹ y mezcla de los antibióticos penicilina 100 UI.ml⁻¹-estreptomina 100 µg.ml⁻¹ (Gibco)]. En esta solución, el tejido se incubó durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido dicho tiempo, se inactivó la papaína mediante dilución con medio de cultivo (DMEM suplementado con antibióticos). Seguidamente, se centrifugó a 1600 rpm durante 5 min empleando una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44 (Alemania).

A continuación, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el medio DMEM suplementado con DNAsa (Sigma, EE.UU.) 3,2 µg.ml⁻¹. Se dejó decantar el tejido no disociado y el sobrenadante conteniendo las células se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min.

Finalmente el sedimento celular se resuspendió en el medio de cultivo especificado en el apartado 4, obteniendo de esta forma la suspensión de neuronas corticales utilizada para la realización de los experimentos.

11. MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de los medios de cultivo y de todos sus suplementos se empleó agua ultra pura obtenida por ósmosis inversa (conductividad 18,2 MΩ).

La esterilización de los medios de cultivo se realizó por filtración empleando filtros estériles con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore). Para controlar la esterilidad, los medios filtrados se incubaron durante 48 h a 37 °C.

El suero fetal bovino (SFB) (PAA, GE Healthcare) empleado para la suplementación de los medios de cultivo fue previamente descomplementado por incubación en baño de agua termostaticado a 56 °C durante 30 min.

A continuación se detallan los medios de cultivos empleados para cada línea celular:

- **rhEPO-CHO.K1:**

Se empleó el medio de cultivo descrito por [Kratje y Wagner \(1992\)](#), que consistió en una mezcla 1:1 (V/V) de los medios D-MEM y Ham's-F12

(Gibco) suplementado con NaHCO_3 (Gibco) $2,441 \text{ g.l}^{-1}$, D(+)glucosa anhidra (Sigma) $1,183 \text{ g.l}^{-1}$, piruvato de sodio (Gibco) $0,110 \text{ g.l}^{-1}$, L-glutamina (Sigma) $1,100 \text{ g.l}^{-1}$, triptófano (Sigma) $0,027 \text{ g.l}^{-1}$, ácido aspártico (Sigma) $0,040 \text{ g.l}^{-1}$, serina (Sigma) $0,080 \text{ g.l}^{-1}$ y SFB $0,1\%$ (V/V).

- **UT-7:**

Se utilizó el medio de cultivo α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modifications*, Gibco) suplementado con NaHCO_3 $1,500 \text{ g.l}^{-1}$, gentamicina (Parafarm, Argentina) $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$, rhGM-CSF (LeucomaxTM, Molgramostim, Argentina) 5 ng.ml^{-1} y SFB 20% (V/V).

- **UT-7/EPO:**

Se utilizó el medio de cultivo empleado para mantener la línea celular UT-7 pero reemplazando el rhGM-CSF por rhEPO 1 U.ml^{-1} (Zelltek S.A., Argentina).

- **TF-1:**

Se empleó el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con L-Glutamina 2 mM , NaHCO_3 $1,500 \text{ g.l}^{-1}$, gentamicina $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$, β -mercaptoetanol (Merck, Alemania) $0,05 \text{ mM}$, rhGM-CSF 20 ng.ml^{-1} y SFB 10% (V/V).

- **PC-12:**

Se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-Glutamina $2,0 \text{ mM}$, NaHCO_3 $2,0 \text{ g.l}^{-1}$, mezcla de los antibióticos penicilina 100 UI.ml^{-1} -estreptomina $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Gibco), suero de caballo (SC) (Gibco) 10% (V/V) y SFB 5% (V/V).

Para determinados ensayos se llevó a cabo la diferenciación de la línea celular a fenotipo neuronal. Para tal fin se utilizó el medio de diferenciación (MD) compuesto por medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con L-Glutamina $2,0 \text{ mM}$, NaHCO_3 $2,0 \text{ g.l}^{-1}$, mezcla de los antibióticos penicilina 100 UI.ml^{-1} -estreptomina $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$, SC 1% (V/V) y NGF 50 ng.ml^{-1} (Invitrogen, EE.UU.).

- **SH-SY5Y:**

Se empleó el medio de cultivo D-MEM/Ham's F-12 1:1, L-Glutamina 2,0 mM, NaHCO₃ 2,438 g.l⁻¹, mezcla de los antibióticos penicilina 100 UI.ml⁻¹-estreptomina 100 µg.ml⁻¹ y SFB 10% (V/V).

- **Cultivo primario de neuronas corticales:**

Se empleó el medio de cultivo Neurobasal (Gibco) suplementado con B-27 2% (V/V) (Gibco), L-Glutamina 2,0 mM y mezcla de los antibióticos penicilina 100 UI.ml⁻¹-estreptomina 100 µg.ml⁻¹.

12. SISTEMAS DE CULTIVO

12.1 Mantenimiento celular y ensayos biológicos

Todas las líneas celulares se cultivaron en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Nuair, EE.UU)

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno [Greiner Bio-one (GBO), Alemania] de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2,0; 5,0 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- Frascos T (GBO) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.

En la mayoría de los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio por cada cm² de superficie, de acuerdo a lo establecido por Freshney ([Freshney, 2000a](#)). Sin embargo, para el caso de la línea celular SH-SY5Y, en ciertos ensayos, dicha relación se modificó a 0,2 ml de medio por cada cm², ya que el crecimiento no se vio afectado y permitió trabajar con menores volúmenes de medio y consumo de reactivos.

Las líneas celulares que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa, como es el caso de la línea celular SH-SY5Y y PC-12. Para realizar subcultivos se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos.

Para el caso de la línea celular SH-SY5Y, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, se procedió a retirar el sobrenadante y lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco) 0,05% (P/V) y Na₂EDTA (Gibco) 0,02% (P/V) en *buffer* fosfato salino [PBS: KH₂PO₄ (Sigma) 0,60 g.l⁻¹, Na₂HPO₄ (Sigma) 0,78 g.l⁻¹, NaCl (Merck) 8,8 g.l⁻¹, pH 7,4] durante 15 s a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar la acción de los factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de 20 µl de solución de tripsina-EDTA por cada cm² de superficie. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción

de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario hasta lograr el desprendimiento completo de las células adheridas. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular.

Para el caso de la línea celular PC-12 que presenta una adherencia leve a la superficie sólida, no es necesario el empleo de soluciones enzimáticas. Por tal motivo, al momento de realizar los subcultivos se las liberó del sustrato por medios mecánicos mediante pipeteos consecutivos hasta lograr el desprendimiento total y la menor cantidad de formación de burbujas.

Para las restantes líneas celulares que crecen en suspensión, los subcultivos se efectuaron por simple dilución en el medio de cultivo fresco correspondiente.

12.2 Biorreactor

El clon rhEPO-CHO.K1 se cultivó en un biorreactor de 25 l (MBR Bio Reactor AG, Suiza) cuyo volumen máximo de trabajo fue de 23,5 l, operando en modo de perfusión. Este proceso consiste en agregar medio de cultivo fresco en forma continua, a medida que se retira la misma cantidad de sobrenadante de cultivo libre de células del interior del reactor (Fig. 13). De esta forma, las células permanecen en el interior del biorreactor, siendo alimentadas con nutrientes y removiéndose los productos del catabolismo en forma continua, permitiendo alcanzar altas densidades celulares con una productividad incrementada del producto de interés durante períodos prolongados de tiempo.

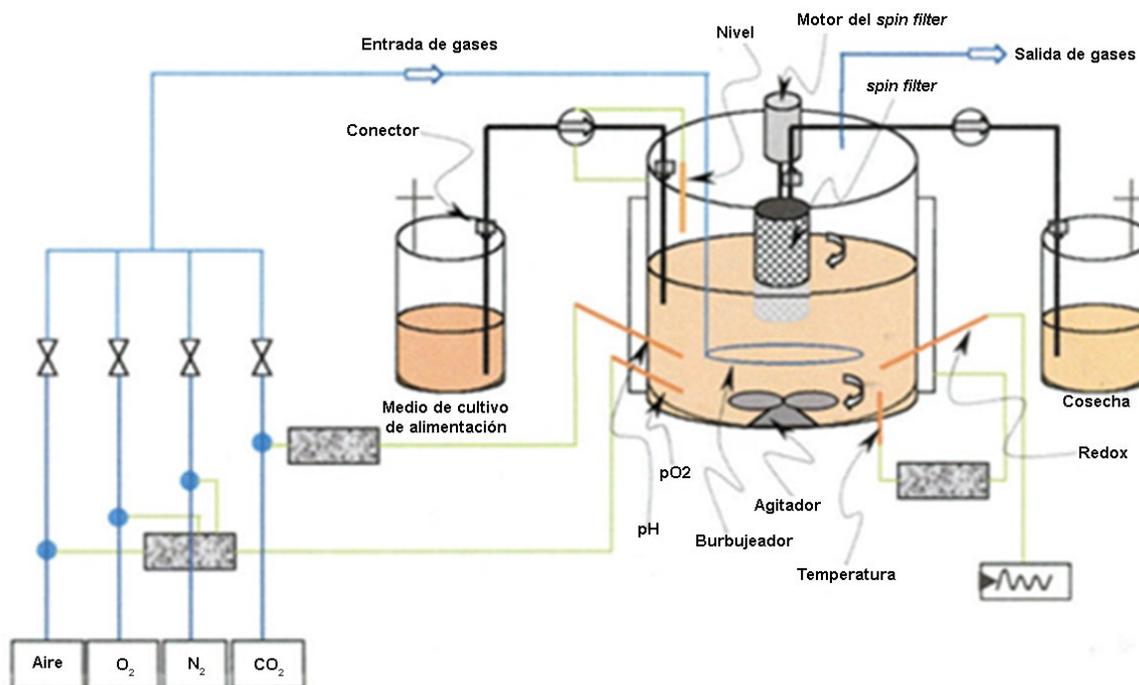


Fig. 13. Esquema del biorreactor empleado (Beccaria, 2000)

La perfusión del cultivo se llevó a cabo empleando un filtro rotatorio (*spin-sieve*) equipado con una malla de acero inoxidable de 10 μm de tamaño ubicado en el interior del reactor. El volumen de perfusión consistió en un volumen de reactor.día⁻¹.

La tensión de oxígeno disuelto, el pH de medio y la temperatura se regularon en forma automática y las variables operacionales, detalladas en la Tabla 1, se monitorearon constantemente.

Tabla 1. Valores de las variables de operación empleadas.

VARIABLE	AJUSTE
Velocidad de agitación	120 rpm
Velocidad de giro del filtro rotatorio	100 rpm
Temperatura del cultivo	37-35 °C
pH inicial del cultivo	7,20
Tensión de oxígeno disuelto en el cultivo	50%

La puesta a punto de las variables operacionales detalladas no formaron parte de esta tesis, este trabajo fue realizado anteriormente por otros integrantes del Laboratorio de Cultivos Celulares.

13. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS VIABLES

El recuento celular se realizó en cámara de *Neubauer*, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán ([Cook y Mitchell, 1989](#)). Esta técnica se basa en el hecho de que las células viables no captan ciertos colorantes, mientras que las células muertas presentan una alteración de la membrana plasmática que permite el ingreso del colorante hacia su interior.

Con este fin, la suspensión celular se incubó durante 1 min con una solución de azul de tripán (Sigma) 0,4% (V/V) en PBS y posteriormente se sembró en la cámara de recuento, empleado diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. Se contaron las células vivas (refringentes) y las muertas (azules), contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos.

La concentración de células (X), ya sean vivas o muertas, se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación (1):

$$X(\text{cél. ml}^{-1}) = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times (\text{dilución})^{-1} \quad (1)$$

La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales (ecuación 2), teniendo en cuenta que la concentración de células totales (X_T) es la suma de la concentración de células muertas (X_M) y vivas (X_V).

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{X_V}{X_T} \times 100 \quad (2)$$

14. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas iniciales ([Freshney, 2000b](#); [Hasegawa, 1996](#)).

El daño celular inducido por el congelamiento y la descongelación es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos ([Hay, 1986](#)). La acción de un agente crioprotector, como glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO) ([Lovelock y Bishop, 1959](#)), y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente 1 °C por min ([Leibo y Mazur, 1971](#)), minimizan dichos efectos.

La conservación de las líneas celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196 °C se observan mínimos deterioros celulares ([Greene y col., 1967](#)). Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta -196 °C.

Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma) en una relación 95:5 (V/V), de manera de obtener una concentración de $1-2 \cdot 10^6$ cél.ml⁻¹. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (GBO) que luego fueron almacenados en un contenedor apropiado, *MrFrosty* (Nalgene, EE.UU), y llevados a freezer de -70°C por 24 h. Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, lo que permite que la temperatura disminuya a razón de 1 °C por minuto, de manera de lograr un enfriamiento gradual de las células para que la revitalización de las mismas sea satisfactoria.

Finalmente los criotubos se retiraron de dicho dispositivo y se almacenaron en termos de N₂ líquido a -196 °C.

15. REVITALIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

El descongelamiento rápido de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de N₂ líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a 37 °C. La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico que contenía 40 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó con el objeto de eliminar el DMSO que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

16. PURIFICACIÓN DE LA NUEVA VARIANTE DE rhEPO

Teniendo en cuenta que la rhEPO producida en líneas celulares eucariotas es una combinación de especies moleculares que comparten una misma cadena, pero difieren en la cantidad de ácido siálico terminal presente en las cadenas oligosacáridicas, y que a estas diferentes formas de EPO se las conoce con el nombre de glicoisofomas o isoformas, la purificación es uno de los puntos claves en el proceso de producción ya que permite obtener la composición deseada de las diferentes isoformas y, de esta manera, se puede dirigir el campo de aplicación.

Además, este proceso es indispensable para la caracterización fisicoquímica y biológica de la molécula.

En la industria farmacéutica la estrategia de purificación típica consiste en cuatro fases o estadios generales denominados ([Belter y col., 1988](#)):

- Remoción de componentes insolubles
- Fase de captura
- Fase de purificación intermedia
- Fase de purificación final

Cada una de ellas puede contar con una o más etapas o procesos unitarios. Las características de cada fase dependerán de numerosos factores tales como la naturaleza del sobrenadante de cultivo, los requerimientos de pureza del producto final y la economía del proceso.

16.1 Material de partida y remoción de componentes insolubles

El sobrenadante de cultivo proveniente del biorreactor fue almacenado en recipientes de plástico estériles de 50 l (Nalgene, EEUU) entre 4 y 8 °C hasta su llenado completo. La remoción de agregados, detritos celulares y coloides se realizó a través de un tren de clarificación constituido por dos cartuchos insertos en sendas carcasas de acero inoxidable (Sartorius) a una presión de hasta 0,5 kgf.cm⁻². Los cartuchos empleados fueron de 10 pulgadas de longitud y tamaño de poro en gradiente de 3 a 0,8 µm (pre-filtro) y 0,8 a 0,45 µm (filtro). La cosecha filtrada fue procesada inmediatamente.

16.2 Fase de captura: Cromatografía de afinidad a colorante

En la fase de captura, los objetivos son el aislamiento, la concentración y estabilización de la proteína de interés a partir del extracto clarificado. Además, es recomendable que exista una remoción significativa de ciertos contaminantes críticos como las proteasas y, en el caso particular de rhEPO, de sialidasas y/o glicosidasas. Por esta razón, en esta etapa juega un papel importante la velocidad de procesamiento, a fin de evitar el contacto prolongado de la proteína de interés con contaminantes potencialmente perjudiciales.

Una de las cromatografías más empleadas en esta etapa es la cromatografía de afinidad a colorante debido al gran número de ventajas que presenta, tales como bajo costo, fácil disponibilidad, resistencia a la degradación biológica y química y pseudobioespecificidad ([Scopes, 1987](#)).

Por tal motivo, para capturar todas las isoformas de rhEPO presentes en el sobrenadante clarificado se utilizó un litro de resina *Blue-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare, Suecia) empaquetado en una columna BPG 100/500 (10 x 12,7 cm). La purificación se llevó a cabo empleando el siguiente protocolo:

1. Equilibrado: la matriz se equilibró en *buffer* fosfatos 50 mM pH 7 a un flujo variable entre 50 y 100 ml.min⁻¹ [Tiempo de residencia (TR) entre 10 y 20 min]. Dentro de este rango de flujo se trabajó durante todo el proceso.

2. Siembra: se sembró un volumen de 18 l de cosecha clarificada.
3. Lavados: la matriz se lavó con 4 a 7 volúmenes de columna (VC) de buffer de equilibrado.
4. Elución: La totalidad de las isoformas de rhEPO adsorbidas fueron recuperadas empleando entre 2,5 y 4 VC de solución NaCl (Merck) 675 mM, etanol (J.T. Baker, EE.UU.) 20% (V/V), Tris (Merck) 20 mM pH 6,5. El producto de elución se concentró hasta un volumen variable entre 500 y 1000 ml y se realizó un cambio de buffer con Tris 20 mM pH 6,5 empleando un sistema de ultrafiltración tangencial Pellicon (Millipore) con cartuchos de 10 kDa de tamaño de poro y 0,1 m² de superficie. Se diafiltró empleando 10 veces el volumen del concentrado. El producto obtenido se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.
5. Conservación de la matriz: La matriz se lavó exhaustivamente con agua ultra pura y se conservó en solución de etanol 20% (V/V) entre 4 y 8 °C hasta su reutilización.

Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura entre 4 y 8 °C.

16.3 Fase de purificación intermedia: cromatografías de intercambio iónico

En la fase de purificación intermedia se busca remover la mayor cantidad posible de impurezas tales como proteínas de la célula huésped, isoformas indeseadas de la proteína de interés, ADN, potenciales partículas virales y endotoxinas.

Dentro de los modos cromatográficos más comúnmente empleados en esta fase se encuentran el intercambio iónico y el hidrofóbico.

En este trabajo de tesis fueron de elección las cromatografías de intercambio iónico (CII) cuyo fundamento se basa en la adsorción reversible de moléculas cargadas a un grupo intercambiador inmovilizado que posee carga opuesta. La fuerza y la selectividad de la unión dependen del pH y la conductividad inicial, por lo que la modificación de estos parámetros es utilizada para eluir selectivamente las moléculas.

16.3.1 Cromatografía de intercambio iónico I

En este primer paso de purificación intermedia, se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico que, además de permitir la separación de diferentes poblaciones de glicoisofomas de rhEPO, es útil para eliminar contaminantes no proteicos tales como ADN.

Para tal fin, el producto obtenido en la etapa de captura fue descongelado a una temperatura entre 4 y 8 °C durante 48 h y diluido con solución de Tris 20 mM pH 6,5, de modo tal que su absorbancia a 280 nm fuese menor a 0,4 unidades arbitrarias.

Posteriormente, fue aplicado en 500 ml de *Q-Sheparose Big Bead* (GE Healthcare) empaquetada en una columna BPG 100/500 (10 x 6,4 cm) empleando el siguiente protocolo:

1. Equilibrado: la matriz se equilibró en Tris 20 mM pH 6,5 a un flujo variable entre 50 y 100 ml.min⁻¹ (TR entre 5 y 10 min). Este flujo fue constante a lo largo de todo el proceso.
2. Siembra: se sembró el volumen de muestra acondicionada necesario para que la carga de la columna no supere los 2 mg.(ml de resina)⁻¹.
3. Lavados: la matriz se lavó con 1,5 a 2,5 VC de buffer de equilibrado.
4. Elución 1: Las isoformas menos ácidas se recuperaron empleando entre 2 y 3 VC de solución de glicina (Invitrogen) 50 mM pH 3,15. El primer VC de eluato fue descartado por contener proteínas provenientes del SFB utilizado para suplementar el medio de crecimiento de las células. El resto de las fracciones se unieron y el volumen total se acondicionó mediante el agregado de buffer acetato de sodio 1 M pH 5 hasta lograr una concentración final de acetatos de 20 mM. Se ajustó a pH 5 mediante el agregado de NaOH 10 N. Este intermediario constituyó el material de partida para la tercera etapa cromatográfica. El producto obtenido se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.
5. Elución 2: El resto de las isoformas retenidas (isoformas más ácidas) se eluyeron empleando una solución de alta fuerza iónica con el fin de acondicionar la columna para su conservación.
6. Lavados: se realizaron lavados secuenciales con NaCl 1 M, agua ultra pura y finalmente NaOH 0,1 M.
7. Regeneración: la matriz se regeneró empleando una solución de NaCl 1 M.
8. Conservación de la matriz: La resina se lavó exhaustivamente con agua ultra pura y se conservó en solución de etanol 20% (V/V) entre 4 y 8 °C hasta su reutilización.

Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura entre 4 y 8 °C.

16.3.2 Cromatografía de intercambio iónico II

Esta etapa consistió en una purificación adicional de las isoformas menos ácidas eluidas en la etapa anterior (elución 1) empleando una segunda cromatografía de intercambio aniónico. Este paso fue necesario para la remoción de trazas de albúmina sérica bovina (BSA) y ADN presentes en el producto.

Para ello se emplearon 200 ml de *Q-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) empaquetados en una columna XK 50/20 (5 x 10,2 cm) y se desarrolló el siguiente protocolo:

1. Equilibrado: la matriz se equilibró con 20 mM de buffer acetato de sodio pH 5 a un flujo de 20 ml.min⁻¹ (TR de 5 min). Este flujo fue constante a lo largo de todo el proceso.
2. Siembra: se sembró el volumen de muestra necesario para que la carga sea como máximo de hasta 2 mg.(ml de resina)⁻¹.
3. Lavados: la matriz se lavó, en primer lugar, con 5 VC de buffer acetato de sodio 20 mM pH 5 y luego con 1 VC de buffer citrato de sodio 20 mM pH 6,5.
4. Elución: Las isoformas menos ácidas se recuperaron en 1 a 2 VC de solución de NaCl 100 mM en citrato de sodio 20 mM pH 6,5.
El producto de elución obtenido se conservó a -20 °C hasta su procesamiento.
5. Lavados: se realizaron lavados secuenciales con NaCl 1 M, agua ultra pura y finalmente NaOH 0,1 M.
6. Regeneración: la matriz se regeneró empleando una solución de NaCl 1 M.
7. Conservación de la matriz: La resina se lavó exhaustivamente con agua ultra pura y se conservó en solución de etanol 20% (V/V) entre 4 y 8 °C hasta su reutilización.

Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura entre 4 y 8 °C.

16.4 Fase de purificación final (Polishing)

En este paso se pretende alcanzar la máxima pureza de la proteína de interés, removiendo posibles agregados, productos de degradación, vestigios de proteínas derivadas de la célula huésped, así como también acondicionar la proteína purificada para su uso inmediato o almacenamiento.

Una de las técnicas cromatográficas más empleadas para este fin es la cromatografía en fase reversa (CFR) cuya principal ventaja es su alta resolución.

El producto obtenido de la segunda cromatografía de intercambio iónico se aplicó en una columna de fase reversa semipreparativa utilizando un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Alliance HPLC System, Waters, EE.UU.) y detección UV a 280 nm.

Se trabajó con una columna C4 Júpiter (Phenomenex, EEUU) de 19,6 ml (250 x 10 mm) rellena con partículas esféricas de 5 µm de diámetro interno y 300 Å de tamaño de poro. La columna se equilibró con ácido trifluoroacético (TFA) 0,05% (V/V) en etanol 50% (V/V) a 1,5 ml.min⁻¹ (constante durante toda la corrida). Se aplicaron 5 ml de muestra por cada inyección, llegándose a realizar hasta 4 inyecciones como máximo por cada corrida. El perfil de elución se compuso de una fase inicial isocrática breve (5 min) en las condiciones del equilibrado y un gradiente lineal hasta 100 % (V/V) de buffer B [TFA 0,05 % (V/V) en etanol] durante 25 min. El pico correspondiente a la nueva combinación de glicoisofomas se recolectó en solución Tris 50 mM pH 8 a los fines de neutralizar el pH ácido de la mezcla elutoria. La

columna se conservó bien cerrada en metanol puro (Fisher, EEUU) a temperatura ambiente.

El lote final de la nueva combinación fue obtenido realizando un cambio de buffer a NaCl 100 mM en buffer citrato de sodio 20 mM pH 6,15 (solución excipiente).

16.5 Determinación de la concentración de proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo empleando el método de [Bradford \(1976\)](#). El fundamento del mismo consiste en el desplazamiento del máximo de absorbancia del colorante azul brillante de *Coomasie* en la zona de longitudes de onda comprendida entre 595 y 620 nm, luego de su unión con los aminoácidos básicos Arg y Lys presentes en la proteína. La intensidad de color generado es directamente proporcional a la concentración de tales aminoácidos y, por lo tanto, de las proteínas presentes en la muestra analizada. Este ensayo es ampliamente aplicable a la cuantificación de la mayoría de las proteínas, con excepción de pequeños polipéptidos básicos y soluciones proteicas que contienen detergentes iónicos o no iónicos en concentraciones superiores al 0,2% (P/V).

La técnica se realizó en microescala empleando placas de microtitulación. Se preparó una curva de calibración utilizando BSA (Sigma) como estándar. Para ello, se realizaron sucesivas diluciones 1:10 de una solución de BSA (desde 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se dispensaron por duplicado 20 μl por pozo de cada dilución. En otros pozos, se dispensaron por triplicado 20 μl de cada muestra. Posteriormente, se adicionaron 200 μl de la solución del colorante [azul brillante de *Coomasie* G-250 (Sigma) 0,01 % (P/V), alcohol etílico 4,75 % (V/V), ácido fosfórico (Merck) 8,5 % (P/V)] a todos los pozos. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a $\lambda=620$ nm en un lector de placas de microtitulación (*Labsystems Multiskan MCC/340*, Finlandia). La concentración de proteínas totales en las muestras incógnitas se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra en la curva de calibración.

16.6 Parámetros evaluadores de la performance de purificación

Un proceso de purificación consiste en una secuencia de operaciones en las cuales los contaminantes son subsecuentemente removidos, aumentando la cantidad de proteínas de interés en relación a las demás proteínas.

Existen tres parámetros básicos a considerar en cada etapa de un proceso separativo:

- Actividad específica (AE)

- Factor de purificación (FP)
- Rendimiento o recuperación (R)

La actividad específica es un parámetro que evalúa en modo porcentual la presencia de la proteína de interés en una muestra compleja. La misma se calculó como el cociente entre la concentración de la proteína de interés (C_{PI}) y la concentración de proteínas totales (C_{PT}) (ecuación 3):

$$AE = \frac{C_{PI}}{C_{PT}} \quad (3)$$

Si este valor de AE es multiplicado por 100 se obtiene el porcentaje de pureza (%).

El factor de purificación es el cociente entre la actividad específica de la muestra obtenida luego del proceso de purificación (AE_2) y la actividad específica previa de la muestra (AE_1). El FP se calculó utilizando la ecuación 4:

$$FP = \frac{AE_2}{AE_1} \quad (4)$$

El rendimiento o recuperación de la purificación fue calculado utilizando la ecuación 5, donde M_F representa la masa de proteína de interés recuperada en el proceso y M_i , la masa inicial presente en la muestra.

$$R (\%) = \frac{M_F}{M_i} \times 100 \quad (5)$$

17. MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE rhEPO

Para la cuantificación de las diferentes variantes de rhEPO se emplearon tres métodos diferentes dependiendo de la complejidad de la muestra a analizar.

17.1 ELISA sándwich amplificado

Para la cuantificación de las diferentes variantes de rhEPO presentes tanto en el sobrenadante de cultivo como en las muestras biológicas complejas (plasma y líquido cefalorraquídeo) se empleó un ELISA sándwich amplificado.

Este ensayo se basa en la captura de la hormona por parte de un anticuerpo que se encuentra inmovilizado sobre placas de poliestireno, que posteriormente es reconocida por el mismo anticuerpo conjugado a biotina. Luego, la adición de estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa permite amplificar la señal, ya que

por molécula de biotina pueden unirse varias moléculas de estreptavidina. Finalmente, al agregar el sustrato específico para esta enzima aparece una coloración medible. La señal obtenida es proporcional a la concentración de hormona presente en la muestra. La muestra se cuantifica al realizar la extrapolación del valor de la señal con respecto a una curva patrón, y considerando su dilución.

La metodología desarrollada se presenta a continuación:

- 1.- Sensibilización: Placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (GBO) fueron sensibilizadas con 100 µl de anticuerpo policlonal α EPO, proveniente de conejo C1 purificado por proteína A, 0,5 µg.ml⁻¹ (50 ng por pozo) diluido en solución de Na₂CO₃ (Merck)/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 2.- Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl por pozo de solución de BSA 1% (V/V) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3.- Primera incubación: En los pozos correspondientes se agregaron diluciones sucesivas 1:2 de estándar de rhEPO (Zelltek, S.A, Argentina) en solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 (MP Biomedicals, EE.UU.) 0,05% (V/V) (solución diluyente), partiendo desde 5-20 ng.ml⁻¹, según la combinación de isoformas de rhEPO analizada. Las muestras procesadas, se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4.- Segunda incubación: Se agregaron 100 µl de anticuerpo policlonal α EPO proveniente de conejo C1 purificado por proteína A conjugado a biotina en una dilución 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5.- Tercera incubación: Se agregaron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa (GE Healthcare) en una dilución 1:8.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 6.- Reacción reveladora: El revelado se realizó mediante reacción enzimática empleando como sustrato H₂O₂ (Merck) 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3, con el agregado de *o*-fenilendiamina (OPD, Sigma) en una concentración de 0,5 mg.ml⁻¹ (solución de revelado). Se agregaron 100 µl de solución de revelado por pozo y, luego

- de 15 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μl de H_2SO_4 2 N. La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=492$ nm en un lector de placas de microtitulación.
- 7.- Controles: Se realizó un control negativo para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos. Para ello, durante la primera incubación, se reemplazó el agregado de antígeno soluble (rhEPO) por 100 μl de solución diluyente y se continuó con las siguientes etapas del ensayo.
- 8.- Cuantificación: Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de rhEPO o sus variantes y las diluciones en escala logarítmica para el estándar y las muestras, respectivamente. La concentración de la muestra se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas ([Milano, 2001](#)).

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de PBS-Tween 20, 0,05% (V/V) (solución de lavado).

17.2 Cromatografía en fase reversa

La cuantificación de las variantes de rhEPO en las muestras y la determinación de su pureza después de cada paso de purificación se realizó empleando una columna de fase reversa analítica utilizando un cromatógrafo líquido de alta *performance* realizando la detección a $\lambda=214$ nm. Se trabajó con una columna C4 *Jupiter* de 4,15 ml (250 x 4,6 mm) rellena con partículas esféricas de 5 μm de diámetro interno y 300 Å de tamaño de poro. La columna se equilibró con una solución acuosa de TFA al 0,05% (V/V) en acetonitrilo (ACN) al 20% (V/V) empleando un flujo de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y se aplicaron 100 μl de muestra mediante inyector automático. El perfil de elución se compuso de una fase inicial isocrática breve (5 min) en las condiciones del equilibrado y un gradiente lineal hasta 100% de *buffer* B (TFA 0,05 % (V/V) en ACN) durante 40 min. El grado de pureza se determinó integrando la totalidad de los picos con el software Empower TM2 (Waters, EEUU) y calculando el porcentaje de área del pico de rhEPO en relación al total. La columna se conservó en metanol puro a temperatura ambiente.

17.3 Espectrofotometría

La cuantificación de las variantes de rhEPO en las muestras puras de elevada concentración se llevó a cabo por medición espectrofotométrica. De esta manera, conociendo su coeficiente de extinción, el cálculo de la concentración se realizó por lectura de absorbancia a $\lambda=280$ nm y 400 nm, utilizando la siguiente ecuación:

$$C(\text{mg.ml}^{-1}) = \frac{(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})^{280} - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})^{400}}{0,743 (\text{mg.ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times L (\text{cm})} \quad (6)$$

donde C es la concentración de la variante de rhEPO; A, la absorbancia a la longitud de onda indicada; 0,743, la absortividad específica de rhEPO a $\lambda=280$ nm ([Kupke y Dorrier, 1978](#)), y L, la longitud de paso óptico (1 cm).

Se empleó un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare) y cubetas de cuarzo.

Las muestras puras fueron diluidas de modo que la lectura quedara entre 0,1 y 1 unidad de absorbancia. Se leyó a 400 nm a fin de corregir la dispersión luminosa producida por la turbidez de la muestra. Todas las determinaciones se realizaron contra el blanco de las soluciones en la cual se encontraba la proteína.

18. MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS ISOFORMAS DE rhEPO

18.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por [Laemmli \(1970\)](#), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical *Mini-Protean 3* (Bio-Rad, EE.UU.). Todos los geles fueron ensayados en condiciones desnaturalizantes, agregando detergente iónico SDS (SDS-PAGE), en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro (β -mercaptoetanol). Se utilizó un gel de apilamiento cuya concentración de acrilamida/bisacrilamida (Sigma) fue del 5% (P/V) y un gel de separación polimerizado con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 12% (P/V). Las muestras se mezclaron con una solución de Tris 50 mM, SDS (Sigma) 2% (P/V), glicerol (J.T. Baker) 10% (V/V), β -mercaptoetanol 5% (V/V), azul de bromofenol (Sigma) 0,05% (P/V), pH 6,8 (solución de preparación de muestras) en proporción 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 3 min y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo a voltaje

constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo hasta que el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

Luego de la electroforesis, se realizó la tinción de las proteínas empleando la solución de colorante [Azul brillante de *Coomasie* R-250 (Sigma) 0,1% (P/V), metanol (Merck) 40% (V/V) y ácido acético (Merck) 10% (V/V) en agua] durante 15 min. Posteriormente, se realizó la decoloración sumergiendo el gel en una solución de metanol 7,5% (V/V) y ácido acético 5% (V/V) hasta la visualización de bandas nítidas contra un fondo claro.

Para la determinación de la masa molecular aparente de las variantes purificadas, se graficó la movilidad electroforética relativa (Rf) en función del logaritmo de la MM. Para ello, se utilizaron marcadores de masa molecular y, luego, el masa molecular aparente se calculó mediante interpolación de los valores de Rf obtenidos para cada muestra en la curva de calibración.

18.2 Espectrofotometría de masa MALDI-TOF

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas (biopolímeros como proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros, dendrímeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

Por tal motivo, para determinar en forma más precisa la masa molecular de las variantes en estudio, las muestras se analizaron empleando un espectrómetro de masa MALDI-TOF automatizado Autoflex™ (Bruker Daltonics, Inc., EE.UU.) en las instalaciones de Gemabiotech S.A. La calibración se realizó empleando el Kit de calibración II (Bruker Daltonics). Para el estudio se sembró 1 µl de la muestra y 1 µl de solución de matriz [ácido sinapínico en solución acuosa TFA al 0,1% (V/V) en ACN al 50% (V/V)] sobre un *AnchorChip* (Bruker Daltonics) y se dejó secar a temperatura ambiente para permitir la cristalización. Posteriormente, se adquirieron los espectros trabajando en modo lineal positivo (<200 espectros acumulados) y se determinó la masa molecular a partir de los mismos.

18.3 Isoelectroenfoque (IEF)

El análisis de la composición del perfil de isoformas obtenidas luego de cada etapa de purificación así como también del lote final se realizó mediante focalización isoelectrónica, utilizando un sistema de GE Healthcare compuesto por una cuba de

electroforesis (Multiphor II), un baño refrigerante (Multitemp III) y una fuente de poder (EPS3500XL).

La técnica de isoelectroenfoque se llevó a cabo en geles de 1 mm de espesor, con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 8% (P/V) en presencia de urea (Invitrogen) 7 M. El rango de pH se obtuvo mediante la mezcla de un 33% (V/V) de anfolitos de pH 3-10 (GE Healthcare) y un 67% (V/V) de anfolitos de pH 2,5-5 (GE Healthcare). Una vez preparado el soporte electroforético, se realizó el preenfocado de los anfolitos durante 1 h a 10 W, 2.000 V y 100 mA, con el fin de generar el gradiente de pH. Posteriormente, se sembraron entre 5 y 20 μ l de las muestras a una distancia de 1 cm desde el cátodo. El enfocado se realizó durante 40 min, empleando las mismas condiciones que para la etapa de preenfocado.

Luego de realizado el isoelectroenfoque, el gel se fijó con ácido tricloroacético (J.T. Baker) 10% (P/V) y ácido sulfosalícilico (Cicarelli) 3,5% (P/V) en solución decolorante [metanol 40% (V/V), ácido acético 10% (V/V) en agua] en agitación durante 30 min. Posteriormente, se incubó en agitación con una solución decolorante durante 1 h. Transcurrido dicho tiempo, el gel fue coloreado con la solución colorante [Azul brillante de *Coomasie* R250 0,125% (P/V), metanol 40% (V/V) y ácido acético 10% (V/V) en agua] incubándolo 30 min. Finalmente, el gel se decoloró por difusión pasiva con la solución decolorante hasta que se visualizaron las bandas nítidas sobre un fondo claro.

18.4 Electroforesis capilar zonal (ECZ)

El análisis del porcentaje de cada isoforma presente en la nueva combinación de glicoisofomas así como también en la rhEPO se realizó por la técnica de electroforesis capilar de zona. El protocolo que se detalla a continuación se empleó para el análisis de la nueva variante y para el caso de la rhEPO se llevó a cabo la metodología propuesta por la Farmacopea Europea 2.0 ([Council of Europe, 2005](#)).

Las muestras a ser analizadas se concentraron a 1 mg.ml⁻¹ y diafiltraron contra agua ultra pura usando membranas de ultrafiltración Amicon Ultra-4 de 10 kDa (Millipore).

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar (Agilent Technologies, EE.UU.) equipado con detector UV a una longitud de onda de 214 nm. La separación electroforética se realizó empleando un capilar de sílica fundida, no cubierto, con un diámetro interno de 50 μ m y una longitud efectiva de 100 cm. El capilar fue previamente acondicionado con una solución de NaOH 0,1 M durante 60 min seguida por *buffer* ECZ [NaCl 0,01 M; tricina (Sigma) 0,01 M, urea 7 M; acetato de sodio

(Merck) 0,01 M y putrescina (Sigma) 2,5 mM] durante otros 60 min. Las corridas se realizaron durante 120 min a 15 kV utilizando buffer ECZ como electrolito en cada reservorio. El capilar fue termostatzado a 35 °C y las muestras fueron almacenadas en el inyector a 4 °C durante el análisis.

El porcentaje de cada isoforma presente en la muestra se determinó integrando la totalidad de los picos con el programa 3D-CE *Chemstation* (Agilent Technologies) y calculando el porcentaje de área de cada pico en relación al total.

19. EVALUACIÓN DE LOS OLIGOSACÁRIDOS UNIDOS TIPO N

El estudio de las variaciones en las cadenas de carbohidratos de la rhEPO es de suma importancia ya que las mismas cumplen un rol importante en la biosíntesis, secreción y actividad biológica. En muchos casos, modificaciones en las porciones de azúcares de la rhEPO incrementan o eliminan completamente su actividad biológica, mientras que mantienen o incrementan su actividad *in vitro*.

El análisis de los oligosacáridos neutros o sializados unidos tipo N se llevó a cabo empleando un sistema de cromatografía iónica ICS-3000 (Dionex, EE.UU) en las instalaciones de *Glycothera GmbH* (Hannover, Alemania). Los oligosacáridos se inyectaron en una columna *CarboPac PA200* (Dionex) y se separaron en sus formas aniónicas mediante cromatografía de intercambio iónico alto pH (HPAEC), usando diferentes gradientes de elución. La detección de las estructuras de los glicanos se realizó por detección amperométrica pulsada (PAD) sin derivatización. Los picos de los oligosacáridos obtenidos por HPAEC-PAD fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los correspondientes a oligosacáridos estándares de referencia.

20. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO SIÁLICO TERMINAL

La determinación del contenido de ácido siálico terminal fue otra de las técnicas que se utilizó para la caracterización fisicoquímica de las variantes de rhEPO. Para tal fin, se empleó el método de Peryodato-Resorcinol descrito por [Jourdian y col. \(1971\)](#) con mínimas modificaciones. El mismo se basa en el método del resorcinol ([Svennerholm, 1957](#)) pero introduce un paso de oxidación con peryodato previo al calentamiento con el reactivo resorcinol. Esto permite determinar el ácido siálico unido a la glicoproteína sin hidrólisis ácida. Es más sensible y no está afectado por lípidos, aminoácidos y azúcares. Además, es capaz de cuantificar el ácido siálico libre y unido a la proteína.

En primer lugar, se preparó una curva de calibración con ácido N-acetilneuramínico (AS, Merck) desde 0 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Por otro lado, las muestras a analizar se diluyeron con agua ultra pura hasta obtener una concentración final de 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A), la cual se verificó mediante lectura espectrofotométrica (apartado 9.3). También, se realizó una dilución 1:2 a partir de la muestra anterior (B).

Seguidamente, se dispensaron por triplicado 250 μl de cada dilución del estándar o de las muestras en tubos de vidrio con tapa esmerilada que contenían 50 μl de ácido periódico 0,04 M. Estas soluciones se mezclaron cuidadosamente y se sumergieron en baño de hielo durante 20 min. Posteriormente, se adicionaron 0,625 ml del reactivo de resorcinol [HCl 16,8 % (P/V), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mM, resorcinol 0,6 % (P/V)], las soluciones se homogeneizaron y fueron secuencialmente colocadas en baño de hielo durante 5 min, baño a 100 °C durante 15 min y finalmente enfriadas en baño de agua a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 0,625 ml de alcohol terbutílico y se mezcló vigorosamente para generar una única fase. Seguido a esto, los tubos se colocaron en un baño de agua a 37 °C durante 3 min para estabilizar el color y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a una $\lambda=630$ nm empleando un espectrofotómetro y cubetas de cuarzo. La concentración de ácido siálico presente en las muestras se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra en la curva de calibración.

El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio \pm SD en moles de ácido siálico por mol de glicoproteína, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{CAS} = \frac{\left[\frac{C_{\text{AS}}}{309} \right]}{\left[\frac{C_{\text{EPO}}}{30.600} \right]} \quad (7)$$

donde, CAS es el contenido de AS [$\text{mol de AS} \cdot (\text{mol de rhEPO})^{-1}$]; C_{AS} es la concentración de ácido siálico ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$); C_{EPO} es la concentración de la variante de rhEPO ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 309 es la masa molecular del AS ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y 30.600 es la masa molecular promedio de la rhEPO ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), sugerido por la Farmacopea Europea ([Council of Europe, 2005](#)).

Los valores se compararon realizando la prueba t de *Student* empleando el programa *GraphPad Prism* 5.1 (GraphPad, EE.UU), considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

21. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA HEMATOPOYÉTICA IN VITRO

El ensayo de valoración de la actividad biológica *in vitro* de la EPO o sus variantes se basa en la cuantificación de los efectos que estas citoquinas inducen sobre la viabilidad y proliferación de las líneas celulares TF-1 y UT-7/EPO que, como se explicó en el apartado 2, tienen la capacidad de crecer en presencia de EPO en forma directamente proporcional a la concentración.

El procedimiento básico consiste en sembrar un determinado número de células en placas de microtitulación e incubarlas con diluciones seriadas de las variantes de rhEPO durante un determinado tiempo. Posteriormente, mediante un método colorimétrico se mide la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo ([Nederman y col., 1990](#)).

Con este fin, se empleó el Kit *Cell Titer 96TMAQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EE.UU.), el cual se compone de dos reactivos:

- MTS
[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonfenil)-2H-tetrazolium] 2 mg.ml⁻¹.
- PMS [metasulfato de fenazina] 0,92 mg.ml⁻¹.

Las enzimas deshidrogenasas catalizan la biorreducción del MTS en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a una longitud de onda de 490 nm. El PMS actúa como dador de electrones en la reacción de óxido-reducción. La cantidad del producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Las condiciones del bioensayo fueron previamente optimizadas por otros integrantes del laboratorio. Para ambas líneas celulares se empleó el mismo protocolo, con pequeñas diferencias entre ellas. Las muestras y los controles se procesaron por triplicado, utilizando el procedimiento que se describe a continuación:

1. En placas estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 50 µl por pozo de diluciones sucesivas 1:2 de las variantes de rhEPO en medio α-MEM suplementado con 20% (V/V) SFB (medio de ensayo para UT-7/EPO) o en medio RPMI suplementado con 10% (V/V) de SFB y 0,05 mM β-mercaptoetanol (medio de ensayo para TF-1). El rango de concentraciones evaluadas varió según la línea celular desde 4 ng.ml⁻¹ hasta 0,01 ng.ml⁻¹ para la línea UT-7/EPO y desde 15 ng.ml⁻¹ hasta 0,06 ng.ml⁻¹ para la línea TF-1.
2. Se realizaron tres tipos de controles:
 - Control de crecimiento: para evaluar la máxima proliferación celular en presencia de una concentración definida de rhEPO. Para ello, se

- colocaron 50 μl del medio crecimiento (UT-7/EPO) o del medio de ensayo al cual se le adicionó rhEPO 7,5 UI.ml⁻¹ (TF-1).
- Control de muerte: para evaluar la máxima proliferación celular en ausencia de rhEPO. Para ello, se colocaron 50 μl de medio de ensayo.
 - Control de reactivo color: para evaluar los reactivos utilizados durante el desarrollo de la reacción colorimétrica. Para ello, se colocaron 100 μl de medio de ensayo en los pozos sin células.
3. Las líneas celulares fueron cultivadas empleando el medio de crecimiento apropiado para su crecimiento (ver apartado 3). Cuando la suspensión celular se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 30 ml de medio basal (medio de lavado). Se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante de lavado. Esta etapa se repitió 3 veces de manera de eliminar la rhEPO o el rhGM-CSF presentes en el medio de crecimiento. Posteriormente, las células se resuspendieron en 5 ml de medio de ensayo correspondiente para cada línea celular y se incubaron 2 h (TF-1) o 4 h (UT-7/EPO) a 37 °C.
 4. Una vez finalizado el tiempo de incubación, las células se resuspendieron en el medio de ensayo correspondiente preparando suspensiones celulares de 2.10⁵ cél.ml⁻¹.
 5. Seguidamente, se adicionaron 50 μl de suspensión celular en cada cavidad (1.10⁴ células por pozo), excepto al control de reactivos, incubándose durante 72 h a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO₂.
 6. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 20 μl por cavidad del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 2 ml de solución MTS con 100 μl de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 4 o 5 h a 37 °C. La absorbancia del cromógeno se midió a $\lambda=492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690$ nm.
 7. Para cada variante de rhEPO analizada se calculó la concentración de EPO que provoca una respuesta media entre la absorbancia del control de crecimiento y la absorbancia del control de muerte (C₅₀). También se calculó la constante aparente de afinidad (k_{Aaf}) empleando la siguiente ecuación:

$$k_{Aaf} = \left[\frac{1}{50} \right] \times 18.398 \times 1.10^6 \quad (8)$$

donde, k_{Aaf} está expresada en l.mol⁻¹, C₅₀ en ng.ml⁻¹, 18.398 es la masa molecular del péptido de EPO (g.mol⁻¹) y 1.10⁶ es el factor de ajuste [(ng.l)(g.ml)⁻¹]. En todos los casos los valores se expresaron como el promedio \pm SD.

La comparación de las medias entre los diferentes tratamientos se realizó aplicando el test t de *Student*, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

22. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA HEMATOPOYÉTICA IN VIVO

La actividad hematopoyética *in vivo* se evaluó midiendo la producción de reticulocitos en ratones normocitémicos empleando la metodología propuesta por la Farmacopea Europea ([Council of Europe, 2005](#)). Se utilizó como estándar la preparación biológica de referencia (BRP) de EPO conteniendo 32.500 UI por vial.

Este procedimiento se llevó a cabo por el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y para tal fin se utilizaron ratones Balb/c de 8 semanas de edad (Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina). Los mismos fueron inyectados en forma subcutánea con 0,5 ml de tres diluciones de las muestras ensayadas y de la solución de referencia que contenían 80, 40 y 20 UI.ml⁻¹ de EPO o su equivalente en masa para el caso de la nueva variante.

Transcurridos 4 días de la administración, se recolectaron muestras de sangre y se realizó la marcación de los reticulocitos con el colorante naranja de tiazol. Posteriormente, la cuantificación del número de reticulocitos se llevó a cabo mediante citometría de flujo. La potencia de las muestras se calculó usando el análisis de líneas paralelas.

23. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VITRO

La actividad neuroprotectora de las variantes de rhEPO se evaluó midiendo tanto la actividad citoprotectora como antiapoptótica empleando las líneas celulares establecidas PC-12 y SH-SY5Y y cultivos primarios de neuronas corticales.

23.1 Ensayo de evaluación de la viabilidad celular

Este ensayo se basa en la capacidad de las variantes de rhEPO para mantener la viabilidad celular luego de someterlas a un determinado estímulo apoptótico. Existe un gran número de estímulos apoptóticos. En este caso, el estímulo apoptótico evaluado dependió de la línea celular.

El procedimiento básico consistió en sembrar un determinado número de células de manera de formar una monocapa, luego incubarlas con distintas diluciones de las variantes de rhEPO durante un determinado tiempo y finalmente someterlas al

estímulo apoptótico el tiempo que fuera necesario en presencia de las moléculas en estudio.

Posteriormente, mediante un método colorimétrico se midió la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas o las enzimas fosfatasas ácidas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo ([Nederman y col., 1990](#); [Yang y col., 1996](#)).

Con este fin, se empleó el Kit *Cell Titer 96TMAQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EE.UU.) (Ver apartado 14) o el sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) (Sigma). En este último caso, las enzimas fosfatasas ácidas intracelulares hidrolizan dicho compuesto a p-nitrofenol que absorbe a una longitud de onda de 405 nm. La cantidad del producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo ([Yang y col., 1996](#)).

Inicialmente, se optimizaron las condiciones del bioensayo con el fin de evidenciar una diferencia significativa entre un control de crecimiento y un control de muerte celular. Las condiciones optimizadas para cada línea celular fueron:

- El tipo de inductor de apoptosis.
- La concentración de dicho inductor, en caso de tratarse de una sustancia química.
- El tiempo de inducción de apoptosis.

Teniendo en cuenta que en trabajos previos se demostró que para que la rhEPO actúe inhibiendo la apoptosis requiere de pretratamiento ([Batistatou y Greene, 1991](#); [Haviv y col., 1997](#)), tanto la rhEPO como la nueva variante se agregaron a los cultivos 24 h antes de la inducción de la muerte celular.

Posteriormente, el protocolo optimizado se utilizó para evaluar la capacidad de las variantes de rhEPO para prevenir la muerte celular causada por un estímulo apoptótico en células PC-12 y SH-SY5Y.

Los ensayos realizados con la línea celular PC-12 se llevaron a cabo empleando placas estériles de fondo plano de 96 cavidades previamente recubiertas con colágeno (Sigma) $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, en las cuales se sembraron $1,5\cdot 10^4$ cél. $\cdot\text{cm}^{-2}$ en medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C. Transcurridas 72 h se reemplazó el medio de crecimiento por medio MD (ver apartado 4) y las células se mantuvieron durante 10 días en estas condiciones con renovación de medio cada 2 días. El día 14 del experimento, las células fueron pretratadas con dos concentraciones de las variantes de rhEPO (7,5 y 37,5 ng. $\cdot\text{ml}^{-1}$) en medio MD, y 24 h después se desencadenó la apoptosis por supresión de suero y NGF reemplazando el medio MD por medio basal durante 48 h en presencia de cada hormona. Se realizaron tres tipos de controles:

- Control de crecimiento: para evaluar la viabilidad celular en un cultivo que no fue sometido al estímulo apoptótico. Para tal fin, las células siempre se mantuvieron en medio MD.
- Control rhEPO: para evaluar si la rhEPO por sí misma tiene un efecto sobre la proliferación celular en esta línea celular. Para tal fin, las células fueron pretratadas e incubadas hasta el día del revelado en presencia de 7,5 ng.ml⁻¹.
- Control de muerte: para evaluar el efecto de estímulo apoptótico. Para tal fin, las células no recibieron tratamiento previo con ninguna variante de rhEPO pero sí fueron sometidas al estímulo apoptótico durante 48 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 20 µl por cavidad del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 2 ml de solución MTS con 100 µl de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 4 o 5 a 37 °C. La absorbancia del cromógeno se midió a λ=492 nm contra lectura de fondo de placa a λ=690 nm. Tanto los controles como los tratamientos se realizaron por sextuplicado.

Para la línea celular SH-SY5Y se emplearon placas estériles de fondo plano de 96 cavidades, en las cuales se sembraron 9,0.10⁴cél.cm⁻² o 1,2.10⁵cél.cm⁻², según el inductor empleado, en medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C. Transcurridas 48 h se reemplazó el medio de crecimiento por medio fresco suplementado con las diferentes concentraciones de las variantes de rhEPO (37,5; 76 y 190 ng.ml⁻¹, según el inductor empleado). Transcurridas 24 h, para inducir la muerte celular se evaluaron dos estímulos apoptóticos [estaurosporina (STP) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA)]. Se conoce que la STP es capaz de inducir apoptosis en un gran número de células ([Boix y col., 1997](#); [Yuste y col., 2002](#)) así como la 6-OHDA, la cual es ampliamente utilizada en modelos de enfermedad de Parkinson, ya que se ha reportado su capacidad para producir cambios bioquímicos y patológicos en el comportamiento de animales de laboratorio, similares a los observados en dicha enfermedad ([Schober, 2004](#)). Las células fueron tratadas con 25 nM de STP (Calbiochem, EE.UU.) o 100 µM de 6-OHDA (MP Biomedicals) durante 24 h en presencia de las variantes de rhEPO (37,5 y 190 o 76 y 190 ng.ml⁻¹, respectivamente).

Los controles realizados fueron los mismos que se describieron anteriormente para la línea celular PC-12, excepto para el control de crecimiento en el que las células se mantuvieron en el medio de crecimiento.

Transcurrido el tiempo de inducción de apoptosis, para el ensayo llevado a cabo con el inductor de apoptosis STP, el revelado se efectuó mediante el agregado del reactivo de color MTS/PMS tal como se describió para la línea celular PC-12. Cuando se emplea 6-OHDA no es posible utilizar dicho revelado ya que los productos de la

oxidación de esta toxina alteran el color del medio de cultivo, interfiriendo con el MTS/PMS e impidiendo una correcta cuantificación ([Huang y col., 2004](#)). Por tal motivo, en esta oportunidad se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se lavaron las células adheridas con PBS; seguidamente se adicionaron 100 µl del reactivo de color preparado en el momento [acetado de sodio 0,1 M pH 5, tritón X-100 (Merck) 0,1 % (V/V), p-NPP 5 mM] y se incubó durante 2 h a 37 °C. La reacción se detuvo con el agregado de 10 µl de NaOH 1 N. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a $\lambda = 405$ nm.

Para ambas líneas celulares, los valores de absorbancia obtenidos para cada tratamiento se referenciaron al control de muerte. Los resultados se expresaron como el promedio del porcentaje de viabilidad respecto a dicho control.

23.2 Métodos para la evaluación de apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso dinámico que presenta diferentes características dependiendo del momento en el cual se encuentre la célula. Esto permite disponer de diferentes marcadores para este evento. Es importante destacar que todos los marcadores no están presentes en todas las células ni todos los marcadores son exclusivos de este proceso. Por lo tanto, al momento de encarar este estudio es necesario conocer qué marcadores pueden ser útiles para el sistema celular en estudio.

Con el objeto de evaluar el efecto de las variantes de rhEPO sobre la apoptosis se evaluó este proceso empleando dos técnicas diferentes que contemplan distintos procesos celulares involucrados en este mecanismo de muerte: condensación de la cromatina y fragmentación del ADN.

23.2.1 Detección de la condensación de la cromatina: Tinción con Hoechst

Morfológicamente, la apoptosis primero se caracteriza por cambios en el índice de refracción de las células ([Hengartner, 1997](#)) seguido por contracción citoplasmática y condensación nuclear. La membrana celular comienza a mostrar protuberancias o picos, dependiendo del tipo de célula y, eventualmente, estas protuberancias o picos se separan de la célula muerta formando cuerpos apoptóticos (Fig.14).

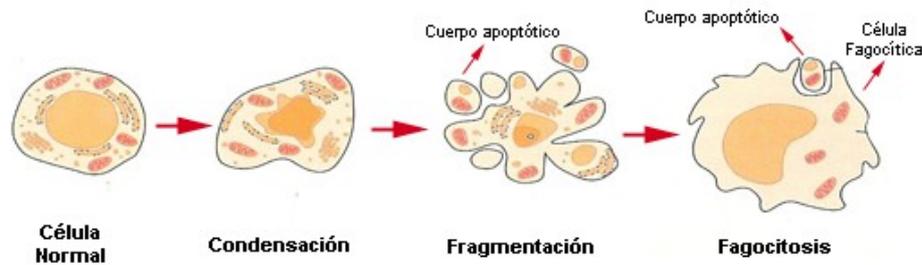


Fig. 14. Cambios morfológicos durante el proceso apoptótico.

Diagrama esquemático que ilustra la progresión de los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas. Al comienzo se produce la condensación de los cromosomas en la periferia del núcleo. También disminuye el tamaño del cuerpo celular, aunque las organelas permanecen intactas. Más adelante se fragmentan el núcleo y el citoplasma y se forman cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células circundantes. Adaptada de [Lodish y col. \(2002\)](#).

Para visualizar la condensación de la cromatina durante el proceso de muerte celular programada se empleó el colorante Hoechst 33258 (Sigma) que tiene la capacidad de intercalarse en las bases del ADN. Se excita con la luz UV ($\lambda=350$ nm) y emite fluorescencia azul con un máximo de emisión a $\lambda=461$ nm.

Este estudio se llevó a cabo empleando la línea celular SH-SY5Y y cultivos primarios de neuronas corticales. Para la línea celular establecida se empleó como inductor de la muerte celular la neurotoxina 6-OHDA y para los cultivos primarios se empleó CoCl_2 , el cual se utiliza como un inductor químico de hipoxia en modelos de hipoxia *in vitro* ([Zhang y col., 2011](#)). El mecanismo de acción radica en la capacidad del cobalto de ocupar el sitio de unión al hierro en el factor inducible por hipoxia HIF-1, impidiendo su degradación ([Al Okail, 2010](#)).

Tanto para la línea celular como para los experimentos empleando cultivo primario, en primer lugar se optimizaron las condiciones del ensayo con el fin de evidenciar una diferencia significativa entre un control de crecimiento y un control de muerte celular. Las condiciones optimizadas fueron:

- La concentración del inductor.
- El tiempo de inducción de apoptosis.

Posteriormente, el protocolo optimizado se utilizó para evaluar la capacidad de las variantes de rhEPO para prevenir la muerte celular causada por el estímulo apoptótico.

Los ensayos realizados con la línea SH-SY5Y se llevaron a cabo empleando placas estériles de fondo plano de 24 cavidades, en las cuales se colocó un cubreobjeto circular de 10 mm de diámetro (Biotraza, China) por pozo. Los mismos

fueron previamente lavados dos veces con acetona durante 10 min cada lavado, luego dos veces con etanol absoluto durante otros 10 min por lavado y finalmente se enjuagaron con agua ultra pura antes de esterilizarlos empleando calor seco (160 °C durante 2 h). Se sembraron $2,0 \cdot 10^5$ cél.cm⁻² en medio de crecimiento y se incubaron durante 48 h a 37 °C.

Transcurrido dicho tiempo, se reemplazó el medio de crecimiento por medio fresco suplementado con las diferentes concentraciones de las variantes de rhEPO (173, 345 y 690 ng.ml⁻¹) y en esas condiciones las células fueron mantenidas durante 24 h. Posteriormente, se indujo apoptosis con 6-OHDA 100 µM durante 4 h en presencia de las moléculas en estudio.

Simultáneamente se realizaron dos controles, un control de muerte y un control de crecimiento, tal como se detalló en la sección anterior.

Finalizados los tratamientos, las células se lavaron cuidadosamente con PBS 1X y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA, Merck) 4 % (P/V) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se expusieron las células al reactivo de Hoechst (10 ng.ml⁻¹) en PBS 1X durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez realizada la marcación, a los fines de retirar el exceso de colorante, se realizaron dos lavados con agua ultra pura. Finalmente, el montaje de los preparados se realizó empleando una gota de líquido de montaje Vectashield® (Vector Laboratories, EE.UU.) y colocando los cubreobjetos con las células hacia el portaobjeto. Se dejó secar el líquido de montaje y se observaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus BX-51TRF, Japón) empleando una longitud de onda de $\lambda = 352$ nm para la excitación y observando la emisión a $\lambda = 461$ nm. Las imágenes se tomaron con una cámara digital color de alta resolución (QImaging® Go-3, QImaging, Surrey, Canadá).

Para los experimentos realizados con cultivos primarios, se emplearon placas estériles de fondo plano de 24 cavidades, en las cuales se colocó un cubreobjeto circular de 10 mm de diámetro (Biotraza, China) por pozo tratados como se detalló anteriormente para el caso de las células SH-SY5Y con la diferencia que en esta oportunidad, además, se incubaron con una solución de poli-L-lisina (Sigma) 0,02% (P/V) en PBS 1X durante 1 h a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron dos veces con agua estéril y se sembraron entre $1,0$ - $1,6 \cdot 10^5$ cél.cm⁻² en medio de crecimiento y se incubaron a 37 °C en atmosfera gaseada.

Una vez que las células adquirieron morfología neuronal (7 días de diferenciación) fueron pretratadas con 395 ng.ml⁻¹ de rhEPO o rhNEPO durante 24 h. Transcurrido dicho tiempo, se desencadenó la apoptosis mediante el agregado de 600

μM de CoCl_2 (Sigma) durante 24 h en presencia de las variantes de rhEPO. Simultáneamente se realizaron los controles de muerte y de crecimiento correspondientes.

Transcurrido el tiempo de inducción de apoptosis, las células se lavaron cuidadosamente con PBS 1X y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA, Merck) 4 % (P/V) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se procedió a realizar una inmunomarcación de la proteína MAP2 presente en las neuronas, para determinar el porcentaje de células neuronales que había en el cultivo. Para tal fin, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% (V/V) en PBS incubándolas durante 15 min a temperatura ambiente y, luego, se lavaron una vez con PBS 1X. A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos con suero normal de cabra (SNO, Natocor, Argentina) al 5 % (V/V) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se aspiró dicho líquido y se incubó con el anticuerpo monoclonal α MAP-2 diluido 1:1000 en la solución diluyente (SNO al 1% (V/V) en PBS) durante toda la noche a 4 °C.

Transcurrido dicho tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario α IgG de ratón conjugado a fluoresceína diluido 1:500 en solución diluyente. Una vez finalizada esta incubación, las células se lavaron nuevamente con PBS 1X y se incubaron con el colorante Hoechst (10 ng.ml^{-1}) en PBS 1X durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente.

Concluida la marcación, a los fines de retirar el exceso de colorante, se realizaron dos lavados con agua ultra pura. Finalmente, el montaje de los preparados se realizó empleando una gota de líquido de montaje Vectashield® (Vector Laboratories, EE.UU.) y colocando los cubreobjetos con las células hacia el portaobjeto. Se dejó secar el líquido de montaje y observaron en el microscopio de epifluorescencia Axiolab (Zeiss, EE.UU) empleando una longitud de onda de $\lambda = 352 \text{ nm}$ para la excitación y observando la emisión a $\lambda = 461 \text{ nm}$. Las imágenes se tomaron con una cámara digital color de alta resolución (Olympus Qcolor3) acoplada al microscopio.

En todos los casos, la cuantificación de los núcleos apoptóticos se realizó mediante el recuento de más de 500 células empleando el programa *Image Pro Plus* 5.1. Todos los tratamientos se evaluaron por duplicado y se realizaron tres ensayos independientes.

23.2.2 Marcación con TUNEL

La degradación del ADN es una de las características más importantes de la apoptosis por lo cual se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula. Uno de los métodos más utilizados es la marcación del ADN simple hebra por medio de una transferasa terminal que adiciona nucleótidos marcados al ADN en extremos 3' libres. Dichos nucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia o, alternativamente, se pueden detectar por métodos de inmunohistoquímica. Este método se conoce como método de TUNEL (*transferase-mediated dUTP nickend-labeling*) y se puede utilizar tanto para la detección por medio de citometría de flujo como por microscopía. Esta técnica permite determinar la presencia de fragmentación de ADN en células individuales ([Alfaro Moreno y col., 2000](#)).

Este estudio se llevó a cabo empleando la línea celular PC-12 y la apoptosis se indujo por supresión de suero y de NGF.

Inicialmente, se optimizó el tiempo de inducción de apoptosis, con el fin de evidenciar una diferencia significativa entre un control de crecimiento y un control de muerte celular. Posteriormente, el protocolo optimizado se utilizó para evaluar la capacidad de las variantes de rhEPO para prevenir la muerte celular causada por el estímulo apoptótico.

Se emplearon placas estériles de fondo plano de 24 cavidades previamente recubiertas con colágeno (Sigma) $10 \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$, en las cuales se sembraron $1,5.10^4 \text{cél}.\text{cm}^{-2}$ en medio de crecimiento y se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Transcurridas 72 h se reemplazó el medio de crecimiento por medio MD (ver apartado 4) y las células se mantuvieron durante 7 días en estas condiciones con renovación de medio cada 2 días. El día 7 del experimento, las células fueron pretratadas con $37,5 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$ ($5 \text{ UI}.\text{ml}^{-1}$) de cada variante de rhEPO durante 24 h. Posteriormente, se desencadenó la apoptosis por supresión de suero y NGF reemplazando el medio MD por medio basal durante 24 h en presencia de cada hormona. Se realizó un control de muerte y uno de crecimiento como se describió en la sección 16.1. Todos los tratamientos se evaluaron por duplicado y se realizaron tres ensayos independientes.

Una vez finalizados los tratamientos, se realizó la marcación de los núcleos apoptóticos empleando el *kit ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101* (Chemicon International, EE. UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La cuantificación de los núcleos apoptóticos se realizó mediante el recuento de más de 500 células a partir de las fotos tomadas empleando el microscopio óptico (Olympus XI50) acoplado a una cámara analógica (Olympus SC35 Type 12).

Los resultados se expresaron como porcentaje de células apoptóticas referenciándolos al control de muerte.

23.3 Expresión de resultados y análisis estadístico

Para los ensayos de la evaluación del efecto neuroprotector de las variantes, los valores se expresaron como valores absolutos relativos al control de crecimiento, mientras que para los ensayos de evaluación de apoptosis los resultados se expresaron como valores absolutos relativos al control de muerte. Para la realización de los gráficos y el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, EE.UU.). La comparación de las medias entre los diferentes tratamientos se realizó mediante análisis estadístico de la varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

24. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE LAS VARIANTES DE rhEPO

Con el propósito de caracterizar la farmacocinética de cada variante de rhEPO se realizaron experimentos *in vivo* empleando animales de experimentación utilizando vías de administración intravascular y extravascular.

En todos los casos se emplearon ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio entre 200-250 g (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina), las cuales fueron mantenidas en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad-libitum*.

24.1 Administración intravascular

Para este estudio farmacocinético las ratas fueron separadas en 11 lotes de 2 animales para cada molécula ensayada (cada lote correspondió a un tiempo evaluado) e inyectadas por vía endovenosa a través de la vena de la cola con una dosis única de 500 µg de cada variante de rhEPO luego de haber sido anestesiadas con la mezcla ketamina (Brouwer S.A., Argentina):xilacina (Alfasan, Holanda) (80 mg.kg⁻¹: 10 mg.kg⁻¹) vía intramuscular.

Transcurrido el tiempo correspondiente desde el momento de la inoculación se procedió a la extracción de sangre a partir de la vena retroorbital empleando capilares heparinizados. Cada muestra de sangre fue centrifugada a 5.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente con el fin de separar el plasma, que fue conservado a -20 °C hasta su posterior utilización.

24.2 Administración extravascular

24.2.1 Vía de inoculación intraperitoneal

Para el análisis farmacocinético utilizando esta vía de administración los animales fueron separadas en 8 lotes de 2 animales para cada molécula ensayada (cada lote correspondió a un tiempo evaluado) e inyectadas en forma intraperitoneal con una dosis única de 500 µg de cada variante de rhEPO. Transcurridos diferentes tiempos post-inyección, se recolectaron las muestras sangre como se describe en la sección 17.1.

24.2.2 Vía de inoculación subcutánea

Para el estudio farmacocinético de las variantes de rhEPO luego de una administración subcutánea, las ratas fueron separadas en 2 lotes de tres animales cada uno. Los animales de cada lote fueron inyectados por vía subcutánea con una dosis única de 200 µg de cada variante de rhEPO. Transcurridos diferentes tiempos post-inyección, se recolectaron muestras de sangre como se describe en la sección 17.1.

24.3 Cuantificación de las variantes de rhEPO en las muestras biológicas

La cuantificación de la citoquina en las muestras se realizó mediante técnica de ELISA sándwich amplificado (apartado 10.1). Con los datos obtenidos se graficó la concentración de cada variante en función del tiempo transcurrido desde su inoculación para cada vía de administración.

24.4 Análisis Farmacocinético

24.4.1 Administración intravascular. Análisis compartimental

Los modelos más comúnmente empleados en farmacocinética son los modelos compartimentales, los cuales analizan el comportamiento de la droga agrupando los tejidos corporales cinéticamente indistinguibles en compartimientos, y describen la transferencia de la droga entre los mismos en términos de constantes de velocidad. Estos modelos pueden clasificarse en monocompartimentales, cuando el organismo actúa como un único compartimiento donde el fármaco se distribuye en forma instantánea, y multicompartimentales, cuando la droga se distribuye a diferentes velocidades según el tejido o fluido del organismo.

El comportamiento de las citoquinas analizadas se ajustó a un modelo bicompartimental, que considera que la droga se distribuye rápida y uniformemente en un compartimiento central o intravascular (representado por la sangre, los fluidos

extracelulares y los tejidos altamente irrigados) y se equilibra más lentamente con un compartimiento periférico o extravascular (constituido por los tejidos con menos flujo sanguíneo) (Shargel y col., 2005a) (Fig. 15).

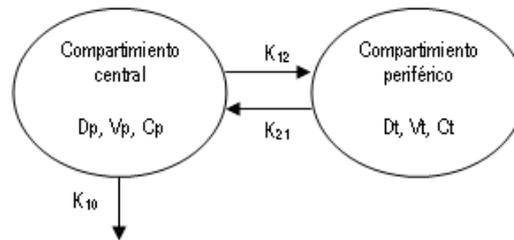


Fig. 15. Modelo abierto de dos compartimientos, inyección intravenosa.

La droga se distribuye en dos compartimientos que alcanzan el equilibrio y se elimina a través del compartimiento central (plasma). La letra D indica la cantidad de droga en el compartimiento central (p) y tisular (t), la letra V, el volumen de los compartimientos y la letra C, la concentración de la droga. Las constantes k_{12} y k_{21} son constantes de velocidad de transferencia entre compartimientos y la constante k_{10} es la constante de eliminación del compartimiento central hacia el exterior del sistema. Adaptada de Shargel y col. (2005a).

El modelo consiste en una simplificación de la compleja cinética de las drogas en el organismo, lo cual supone la aceptación de una serie de hipótesis:

- El sistema es abierto porque el fármaco puede ser eliminado del mismo.
- Los compartimientos no son una región fisiológica o anatómica, sino que son un conjunto de tejidos o fluidos que poseen similar flujo sanguíneo y afinidad por la droga.
- Se considera que la droga está uniformemente distribuida dentro de cada compartimiento.
- La transferencia de la droga entre compartimientos es un proceso reversible con una cinética de primer orden.

En el modelo de dos compartimientos, la curva de concentración plasmática de la droga en función del tiempo transcurrido desde su inyección tiene una forma biexponencial decreciente, la cual resulta de la suma de dos procesos de primer orden: distribución y eliminación (Fig. 16A). Este modelo asume que, a tiempo cero, no existe droga en el compartimiento tisular. Luego de una inyección endovenosa, la droga se equilibra rápidamente en el compartimiento central. La fase de distribución de la curva (o fase α) representa la remoción inicial de la droga del compartimiento central hacia el compartimiento periférico. Aunque la eliminación y la distribución ocurren simultáneamente durante la fase de distribución, existe una transferencia neta de la droga del compartimiento intravascular a los tejidos. Cuando la concentración tisular alcanza su valor máximo, que puede ser superior o inferior a la concentración plasmática, la velocidad de entrada de la droga a los tejidos iguala la velocidad de

salida, alcanzándose un equilibrio con la fracción de droga en el compartimiento central. En este momento, la concentración de la droga en ambos compartimientos disminuye en forma paralela (Fig. 16B). Esta disminución es un proceso de primer orden y se denomina fase de eliminación (o fase β). La mayoría de los modelos bicompartimentales asume que la eliminación ocurre desde el compartimiento central (Fig. 15), ya que los principales sitios de depuración de fármacos son órganos altamente irrigados, como los riñones y el hígado. Las k_{12} y k_{21} son constantes de velocidad de primer orden que gobiernan la velocidad de transferencia de la droga fuera y dentro del torrente sanguíneo, respectivamente, mientras que la constante k_{10} es la constante de eliminación del organismo.

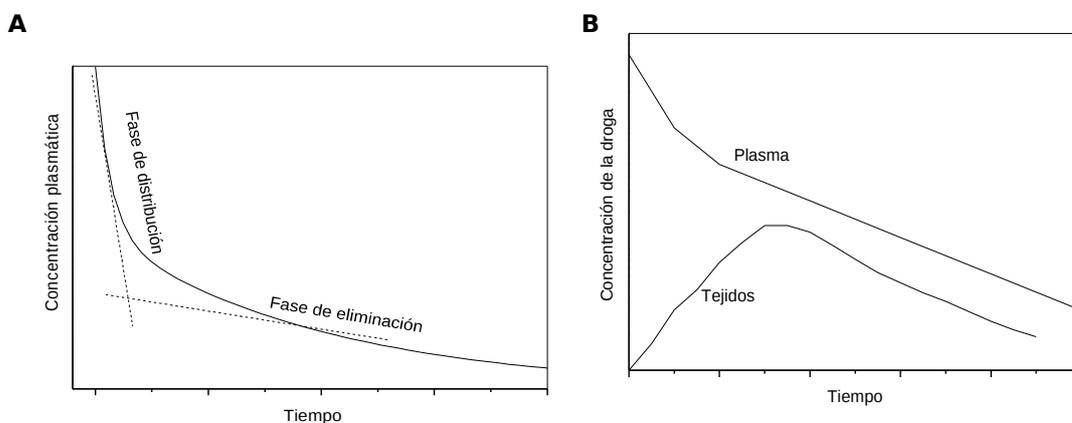


Fig. 16. Perfil plasmático y tisular de una droga inyectada mediante vía endovenosa cuyo comportamiento se ajusta a un modelo de dos compartimientos.

- A.** La curva de concentración plasmática de la droga en función del tiempo transcurrido desde su inyección tiene una forma biexponencial decreciente que denota la existencia de dos procesos: distribución y eliminación.
- B.** La concentración de la droga en los tejidos alcanza un máximo, luego del cual disminuye en forma paralela a la concentración plasmática. Adaptada de [Shargel y col. \(2005a\)](#).

De esta manera, la variación de la concentración del fármaco en el plasma (C_p) en el tiempo puede ser descrita de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_{21}C_t - k_{12}C_p - k_{10}C_p \quad (9)$$

donde C_t es la concentración del fármaco en los tejidos. Integrando la ecuación 9 se obtiene;

$$C_p = \frac{D_p^0}{V_p} \left(\frac{k_{21}-a}{b-a} e^{-at} + \frac{k_{21}-b}{a-b} e^{-bt} \right) \quad (10)$$

donde C_p es la concentración del fármaco remanente en la circulación al tiempo t , D_p^0 es la dosis inicial inyectada, V_p es el volumen del compartimiento central y a y b son constantes que dependen únicamente de k_{12} , k_{21} y k_{10} . La ecuación anterior puede ser transformada en la siguiente expresión:

$$C_p = Ae^{-at} + Be^{-bt} \quad (11)$$

Las constantes A y B son constantes híbridas que dependen de la dosis inicial, por lo que no tienen un significado fisiológico real. Las constantes a y b son constantes de velocidad para la fase de distribución y eliminación, respectivamente, y permiten el cálculo de los tiempos de vida media de distribución o fase α ($t_{1/2\alpha}$) y de eliminación o fase β ($t_{1/2\beta}$), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln 2}{a} = \frac{0,693}{a} \quad (12)$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln 2}{b} = \frac{0,693}{b} \quad (13)$$

Los datos experimentales se ajustaron a la función exponencial que describe la ecuación 11 utilizando el complemento de Excel® denominado PKSolver. Este software realiza el análisis bicompartamental y arroja todos los parámetros farmacocinéticos más comúnmente utilizados. A continuación se describe cómo la correcta sustitución de las constantes a , b , A y B en las ecuaciones 12, 13, 14, 15 y 16, permite obtener los valores de tales parámetros.

$$k_{10} = \frac{ab(A+B)}{Ab+Ba} \quad (14)$$

$$k_{12} = \frac{AB(b-a)^2}{(A+B)(Ab+Ba)} \quad (15)$$

$$k_{21} = \frac{Ab+Ba}{A+B} \quad (16)$$

En general, una droga se equilibra rápidamente en el cuerpo. Sin embargo, cada tejido individual puede tener una concentración distinta de medicamento debido a las diferencias en la afinidad hacia el mismo. El volumen de distribución (V_D) es un parámetro útil que relaciona la concentración plasmática con la cantidad total de droga en el organismo. El volumen de distribución puede considerarse como el volumen "aparente", dado que no tiene un significado fisiológico en términos de espacio anatómico en el cual se disuelve la droga.

El volumen del compartimiento central (V_p) o volumen de distribución inicial es útil para determinar la concentración de la droga inmediatamente después de una inyección intravenosa. A tiempo cero no se produce eliminación de la droga, por lo que:

$$V_p = \frac{D_p^0}{C_p^0} \quad (17)$$

Donde D_p^0 es la dosis inyectada por vía endovenosa y C_p^0 es la concentración plasmática a tiempo cero. En este mismo momento, dado que $t=0$, entonces $e^{-kt} = 1$, por lo que la ecuación 11 se reduce a la siguiente expresión:

$$C_p^0 = A + B \quad (18)$$

Reemplazando la ecuación 17, se obtiene la expresión 19, que permite calcular V_p mediante la determinación de A y B:

$$V_p = \frac{D_p^0}{A + B} \quad (19)$$

En el estado estacionario, la velocidad de entrada al compartimiento tisular o periférico desde el compartimiento central es igual a la velocidad de salida, por lo que:

$$D_t k_{21} = D_p k_{12} \quad (20)$$

La cantidad total de droga en el estado estacionario es igual a la suma de la cantidad de droga en el compartimiento tisular (D_t) y la cantidad de droga en el compartimiento central (D_p). Por lo tanto, el volumen de distribución aparente en el estado estacionario, $(V_D)_{ss}$, se puede calcular dividiendo la cantidad total de droga en el organismo por la concentración de la droga en el compartimiento central en este mismo estado:

$$(V_D)_{ss} = \frac{D_p + D_t}{C_p} \quad (21)$$

La magnitud de $(V_D)_{SS}$ depende de factores hemodinámicos responsables de la distribución de la droga y de las propiedades físicas de la misma, las cuales determinan la cantidad intra o extravascular relativa que permanece en el cuerpo. Por lo tanto, constituye un parámetro importante cuando se comparan drogas con características diferentes.

Otro parámetro importante que describe una droga en un sistema dado es su depuración del organismo o *clearance*. El *clearance* es una medida de la eliminación del fármaco del organismo que no requiere identificar los mecanismos involucrados. Se define como el volumen de plasma que es depurado de la droga por unidad de tiempo. Este parámetro puede ser calculado sin tener en cuenta el tipo de modelo, por lo que puede verse como un concepto fisiológico de remoción del fármaco. El *clearance* (CL) se calculó como la dosis inyectada, D_0 , dividido por el área bajo la curva de concentración de droga en plasma en función del tiempo, ABC (ecuación 22):

$$CL = \frac{D_0}{\int ABC dt} \quad (22)$$

Para la evaluación farmacocinética de cada variante se presentan los parámetros $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, CL y $(V_D)_{SS}$ y se expresaron como el valor promedio \pm SD ($n=2$). El análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros obtenidos para cada molécula se realizó empleando el test *t* de *Student* o *t* de *Student* con la corrección de Welch, según los parámetros presentaran varianzas iguales o desiguales, respectivamente, considerando diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

24.4.2 Administración extravascular. Análisis no compartimental

En comparación con la vía endovenosa, la farmacocinética de una droga suministrada por vía extravascular es más difícil de modelar. Los modelos farmacocinéticos para las vías extravasculares deben tener en cuenta la absorción sistémica del fármaco desde el sitio de administración hacia el plasma. Además, la administración extravascular se complica debido a variables en el sitio de absorción, incluyendo posible degradación de la droga y diferencias significativas en la velocidad y grado de absorción entre individuos, por lo cual puede llegar a ser muy complicado el modelado de estos datos, sumado a que es dificultoso seleccionar un modelo que pueda ser aplicable a las diferentes vías de administración ([Shargel y col., 2005b](#)). Por tales motivos, se seleccionó el análisis no compartimental para los datos obtenidos para las vías extravasculares.

A diferencia de los modelos compartimentales, el análisis farmacocinético no compartimental consiste en estimar parámetros farmacocinéticos sin la necesidad de ajustar los datos a un determinado modelo matemático. Sin embargo, puede llegar a ser aplicado a algunos modelos compartimentales, asumiendo una farmacocinética lineal ([Gillespie, 1991](#)).

Este análisis se basa en la teoría de los momentos estadísticos, donde las curvas de concentración de droga en función del tiempo se tratan como curvas de distribución estadística. Con ese fin, se supone que las moléculas se distribuyen y eliminan al azar y, por lo tanto, dicha curva sigue una distribución normal con una media y una varianza. La aplicación del concepto de los momentos estadísticos en los tratamientos farmacocinéticos fue desarrollado, en forma simultánea, por [Cutler \(1978\)](#) y [Yamaoka y col. \(1978\)](#).

El tránsito de las moléculas de un fármaco a través del organismo es un proceso estocástico. Es decir, el movimiento de las moléculas individuales a través del cuerpo está gobernado por la probabilidad ya que ellas no pueden ser absorbidas, metabolizadas o excretadas todas al mismo tiempo.

El perfil de concentración plasmática en función del tiempo, luego de una dosis de un fármaco, puede ser considerada como una curva de distribución estadística donde los tres primeros momentos (cero al segundo) de la curva se denominan S_0 , S_1 y S_2 y se definen como:

$$S_0 = \int_0^{\infty} C(t).dt = ABC \quad (23)$$

$$S_1 = \int_0^{\infty} t \cdot C(t).dt = ABCM \quad (24)$$

$$S_2 = \int_0^{\infty} t^2 \cdot C(t).dt \quad (25)$$

donde t es el tiempo, ABC es el área bajo la curva de concentración en función del tiempo y $ABCM$ es el área bajo la curva de la concentración por el tiempo en función del tiempo.

El tiempo medio de residencia se define como el tiempo medio requerido para que las moléculas intactas transiten a través del cuerpo e involucra todos los procesos cinéticos, incluyendo la liberación "*in vivo*" desde la forma farmacéutica, la absorción y todos los procesos de disposición. Representa el tiempo necesario para que el 63,2% de la dosis administrada sea eliminada por todos los procesos.

Teniendo en cuenta los momentos estadísticos descriptos anteriormente, se puede definir el tiempo de residencia del fármaco en el organismo como una distribución de frecuencias con una media y una varianza alrededor de esta media. A continuación se presentan las fórmulas para el cálculo del tiempo de residencia medio (TMR) y su varianza (VRT).

$$\text{TMR} = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot C \cdot dt}{\int_0^{\infty} C \cdot dt} = \frac{[\text{ABCM}]_0^{\infty}}{[\text{ABC}]_0^{\infty}} = \frac{S_2}{S_1} \quad (26)$$

$$\text{VRT} = \frac{\int_0^{\infty} (t - \text{TMR})^2 C \cdot dt}{\int_0^{\infty} C \cdot dt} \quad (27)$$

Estas ecuaciones son útiles cuando el fármaco es administrado por una vía intravascular. Sin embargo, cuando el suministro de la droga se efectúa a través de una vía extravascular se debe considerar el tiempo asociado al proceso de absorción desde el reservorio de administración (por ejemplo, tejido celular subcutáneo, cavidad intraperitoneal, etc) hacia el compartimiento central. Por lo cual, el TMR de un fármaco administrado por una vía extravascular, se denomina TMR_{ev} y está representado por la siguiente ecuación:

$$\text{TMR}_{\text{ev}} = \text{TMR}_{\text{iv}} + \text{TMA} \quad (28)$$

donde TMR_{iv} es el tiempo de residencia medio calculado para la administración endovenosa del fármaco y el TMA corresponde al tiempo requerido para que la droga alcance el compartimiento central. Por lo tanto, el TMA puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\text{TMA} = \text{TMR}_{\text{ev}} - \text{TMR}_{\text{iv}} \quad (29)$$

A partir del TMA puede calcularse una constante de absorción aparente a partir de la siguiente ecuación:

$$K_{\text{aap}} = \frac{1}{\text{TMA}} \quad (30)$$

La biodisponibilidad es una medida de la disponibilidad sistémica de una droga. Se refiere a la velocidad y grado en los cuales el principio activo de una droga se torna

disponible en el sitio de acción. Se puede definir como la fracción de la dosis administrada de un fármaco que llega al plasma sanguíneo luego de los procesos de absorción y que está disponible para cumplir su efecto farmacológico. Dentro de los factores que afectan la biodisponibilidad de un medicamento se encuentran el tipo de producto (solución, suspensión, etc.), la naturaleza de los excipientes, las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la vía de administración. La biodisponibilidad es la disponibilidad sistémica de una droga luego de una administración extravascular (por ejemplo, oral, subcutánea, intraperitoneal, etc.) en comparación con la dosis intravascular. La biodisponibilidad (F) se calculó en forma porcentual, aplicando la siguiente ecuación.

$$F (\%) = \frac{ABC_{ev}}{ABC_{iv}} \times \frac{D_{iv}}{D_{ev}} \times 100 \quad (31)$$

donde, ABC_{ev} es el área bajo la curva obtenida luego de la administración extravascular, ABC_{iv} es el área bajo la curva obtenida luego de la administración intravenosa, D_{iv} es la dosis (masa) inyectada vía endovenosa y D_{ev} es la dosis inyectada por una vía extravascular.

El *clearance* aparente (CL_{app}) de una droga administrada vía extravascular se define como el *clearance* determinado luego de una inyección endovenosa, CL , dividido por la biodisponibilidad calculada para la vía correspondiente, F. Por lo tanto, la expresión que permite realizar este cálculo es la siguiente:

$$CL_{app} = \frac{CL}{F} = \frac{D_{ev}}{ABC_{ev}} \quad (31)$$

Los parámetros farmacocinéticos T_{max} y C_{max} se obtuvieron por observación directa a partir de los datos experimentales recolectados. La teoría de los momentos estadísticos no permite calcular mediante una ecuación matemática dichos parámetros.

Los perfiles de concentración en función del tiempo en cada muestra biológica estudiada fueron analizados para cada grupo de datos y los cálculos de los diversos parámetros se realizaron empleando el complemento para Excel® PKsolver. Los parámetros farmacocinéticos T_{max} , C_{max} , TMR_{ev} , TMA, K_{aap} , CL_{app} y F se expresaron como el promedio \pm SD de los datos obtenidos para cada animal (intraperitoneal n=2 y subcutánea n=3). Los parámetros farmacocinéticos de ambas moléculas fueron comparados utilizando el test t de *Student* o t de *Student* con la corrección de Welch, según los parámetros presentaran varianzas iguales o desiguales, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

25. EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMÁTOENCEFÁLICA

Con el fin de evaluar la capacidad de las diferentes combinaciones de isoformas de rhEPO para atravesar la barrera hematóencefálica se extrajeron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) a los animales de experimentación que recibieron una dosis única de cada variante de rhEPO por vía intravascular o extravascular.

25.1 Construcción del dispositivo de punción

Para construir el dispositivo de punción se removió la aguja 25G x 5/8" (Neojet, China) de su cono y se fusionó a un capilar de vidrio no heparinizado (Parawal, Argentina) de 75 mm de longitud y un diámetro externo de 1,50 mm. Luego, este tubo fue adjuntado a un catéter de silicona de 2 mm de diámetro (Tubo nasogástrico K-33, Laboratorio Rivero, Argentina) conectado a una jeringa (TJ, Argentina) (Fig. 17).

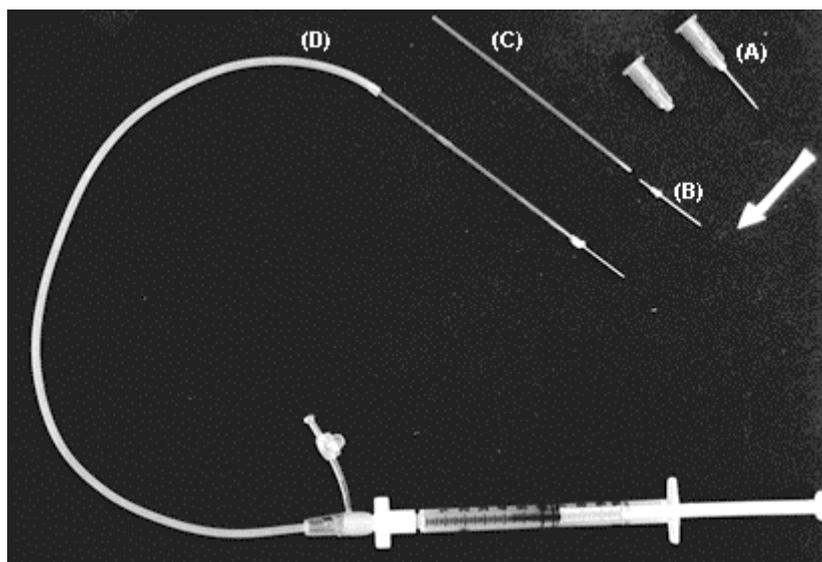


Fig. 17. Dispositivo empleado para la recolección de LCR.

Se observa secuencialmente el armado dicho dispositivo. A: aguja utilizada, B: aguja sin el cono, C: capilar no heparinizado, D: dispositivo completo.

25.2 Extracción de LCR

Se emplearon los mismos animales que se describieron en el apartado 17.1 y 17.2.1. (vía endovenosa e intraperitoneal, respectivamente), a los cuales antes de realizarle la toma de muestra de sangre se le efectuó la extracción de LCR como se detalla a continuación.

Minutos antes de la extracción se anestesiaron con la mezcla ketamina:xilacina (80 mg.kg^{-1} : 10 mg.kg^{-1}) vía intramuscular. Seguidamente, con el animal anestesiado, se rasuró la piel de la parte posterior del cuello y el área fue desinfectada con cloroxilenol. Luego, se inyectó en forma subcutánea una solución de lidocaína:epinefrina (20 mg.ml^{-1} : $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$) (Scott-Cassara, Argentina) entre la parte posterior de la zona suboccipital y el cuello, con el fin de evitar el sangrado durante la extracción. Posteriormente, se realizó una incisión en la línea media de la piel y el tejido subcutáneo en dirección cefalocaudal con una hoja de bisturí N° 15. Los músculos superficiales se separaron por disección roma hasta la visualización del plano aponeurótico prevertebral. Inmediatamente las ratas se sujetaron manualmente con el fin de lograr la hiperflexión de la cabeza para una apertura máxima del espacio suboccipital. Después de localizar por palpación el área romboidal deprimida correspondiente al espacio atlantooccipital, se definió el sitio de punción para acceder a la cisterna magna como la intersección de una línea imaginaria vertical extendida desde la protuberancia occipital externa hasta el proceso espinal C1 y una línea horizontal entre los dos apófisis mastoideas (Fig. 18). Una vez identificado, se insertó el dispositivo de punción y se tomó una muestra de LCR mediante aspiración suave (aproximadamente $50\text{-}75 \text{ }\mu\text{l}$) ([Ceaglio y col., 2013](#)). La muestra incolora se conservó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su procesamiento. Para terminar el proceso, los animales fueron suturados con material reabsorbible Dexon 4/0 empleando una aguja curva atraumática, se les extrajo sangre (apartado 17.1) y se depositaron en sus jaulas hasta su recuperación.

La cuantificación de la citoquina en las muestras se realizó mediante técnica de ELISA sándwich amplificado (apartado 10.1). Con los datos obtenidos se graficó la concentración de cada variante en función del tiempo transcurrido desde su inoculación.

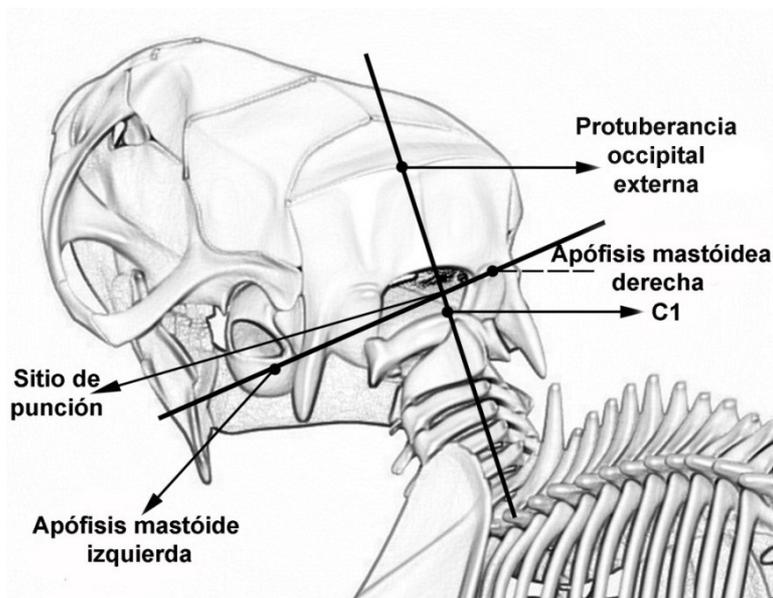


Fig. 18. Sitio de punción para acceder a la cisterna magna.

Ilustración esquemática del cráneo y cuello de la ratona donde se muestra al sitio anatómico para efectuar la punción como la intersección de una línea imaginaria vertical extendida desde la protuberancia occipital externa hasta el proceso espinal C1 y una línea horizontal entre los dos apófisis mastoideas

25.3 Apertura osmótica de la BHE

Una estrategia ampliamente utilizada para incrementar la distribución de diferentes drogas en el sistema nervioso es la disrupción osmótica reversible de la BHE empleando soluciones hiperosmolares de arabinosa ([Rapoport, 2000](#)) o manitol ([Brown y col., 2004](#); [Rapoport, 2000](#)), tradicionalmente, por vía intraarterial ([Bellavance y col., 2008](#)) aunque en los últimos años también se reportó su uso por vía endovenosa ([McCarty y col., 2009](#); [Seyfried y col., 2008](#); [Yang y col., 2011](#)). Teniendo en cuenta esto, se administró por vía endovenosa una dosis única de la variante de rhEPO (500 μg) en una solución de manitol 1,1 M a ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio entre 200-250 g (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina), las cuales fueron mantenidas bajo las mismas condiciones descritas en la sección 17. Las ratas fueron separadas en 11 lotes de 2 animales para cada molécula ensayada (cada lote corresponde a un tiempo evaluado).

Transcurridos diferentes tiempos post-inyección, se recolectaron las muestras de LCR tal como se detalla en el apartado 18.2 y de sangre (apartado 17.1).

25.4 Análisis farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon empleando el programa PKsolver (Microsoft Office Excel) a partir de los datos obtenidos luego de la administración endovenosa en presencia o ausencia de manitol aplicando el análisis no compartimental de los datos (ver apartado 17.4.2).

Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron T_{max} , C_{max} y ABC_{0-1h} y se expresaron como el promedio \pm SD de los datos obtenidos (n=2). Las diferentes moléculas fueron comparadas utilizando el test t de *Student* o t de *Student* con la corrección de Welch, según los parámetros presentaran varianzas iguales o desiguales, respectivamente, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

26. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VIVO

Con el objeto de evaluar el efecto de las variantes de rhEPO en un modelo de daño neuronal *in vivo*, se trabajó en colaboración con el Laboratorio de Neurotoxicidad, Neuroprotección y Neurorreparación perteneciente al Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN-Conicet) de la Facultad de Medicina de la UBA bajo la dirección de la Dra. Alicia Brusco. Dicho laboratorio tiene una amplia experiencia en el trabajo con modelos de daño neuronal.

26.1 Modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media se basa en la capacidad de generar una isquemia cerebral controlada impidiendo el flujo sanguíneo al área del cerebro irrigada por esta arteria. El mismo puede ser en forma transitoria o permanente. En esta oportunidad se llevó a cabo un modelo de isquemia focal permanente.

Para este estudio se emplearon 60 ratones Balb/c machos, de un mes de edad, con un peso promedio de 20-25 g (Bioterio de Esperanza, Argentina), los cuales fueron mantenidos en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad-libitum*.

Antes de la cirugía, los animales fueron anestesiados con la mezcla de ketamina:xilacina (100 mg.kg⁻¹: 10 mg.kg⁻¹). Posteriormente, se realizó una incisión en forma perpendicular a la línea que une el canto externo del ojo derecho y el conducto auditivo externo para exponer y retraer el músculo temporal. El cráneo fue perforado por una trepanación, se retiró la duramadre y la arteria cerebral media (ACM) fue ocluida de forma permanente empleando pinzas de electrocoagulación bipolar CO-20

(BEIC, Argentina) [(Liesz y col., 2009; Wagner y col., 2011), modificado para ratones]. La lesión de la piel se suturó y el ratón se mantuvo en una jaula individual hasta la recuperación de la anestesia. La operación control se realizó como se describió anteriormente, excluyendo la coagulación de la ACM. La tasa de supervivencia de los animales hasta el final del experimento fue de 100%.

26.2 Diseño experimental y grupos experimentales

El diseño experimental consistió en 8 días de tratamiento contando a partir del día 0 hasta el día 7 que comprendió desde el entrenamiento de los animales hasta el sacrificio de los mismos. En la Fig. 19 se detalla el diseño empleado.

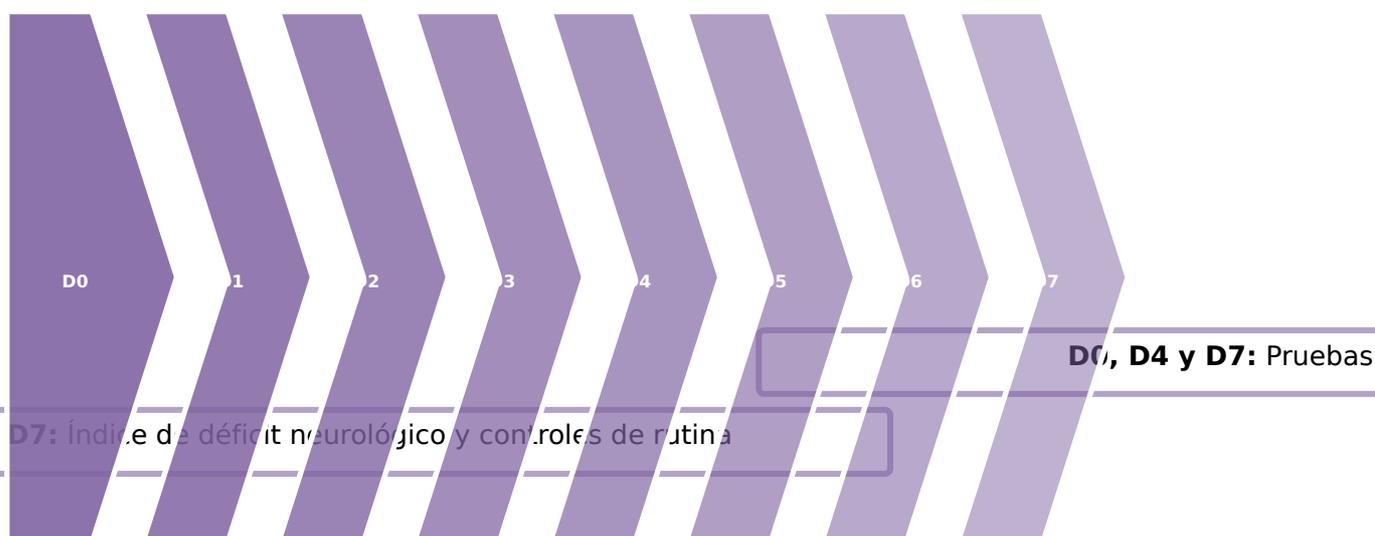


Fig. 19. Esquema de trabajo.

En la figura se representa la línea de tiempo en el cual se desarrolló el experimento. La misma abarca desde el día 0 (D0) hasta el día 7 (D7). Los rectángulos que se encuentran por debajo determinan el periodo o los días en los cuales se realizaron distintas actividades.

Los animales fueron divididos en dos tandas de 30 animales y, a su vez, cada una de ellas en 6 grupos experimentales que se detallan en la Fig. 20. Con un total de 10 animales por grupo al final de experimento. La primera tanda se empleó para realizar estudios morfológicos mediante IHQ y evaluación de la actividad motora (n=5), mientras que la segunda tanda se empleó sólo para evaluar actividad motora con la finalidad de aumentar el número de animales (n=5).

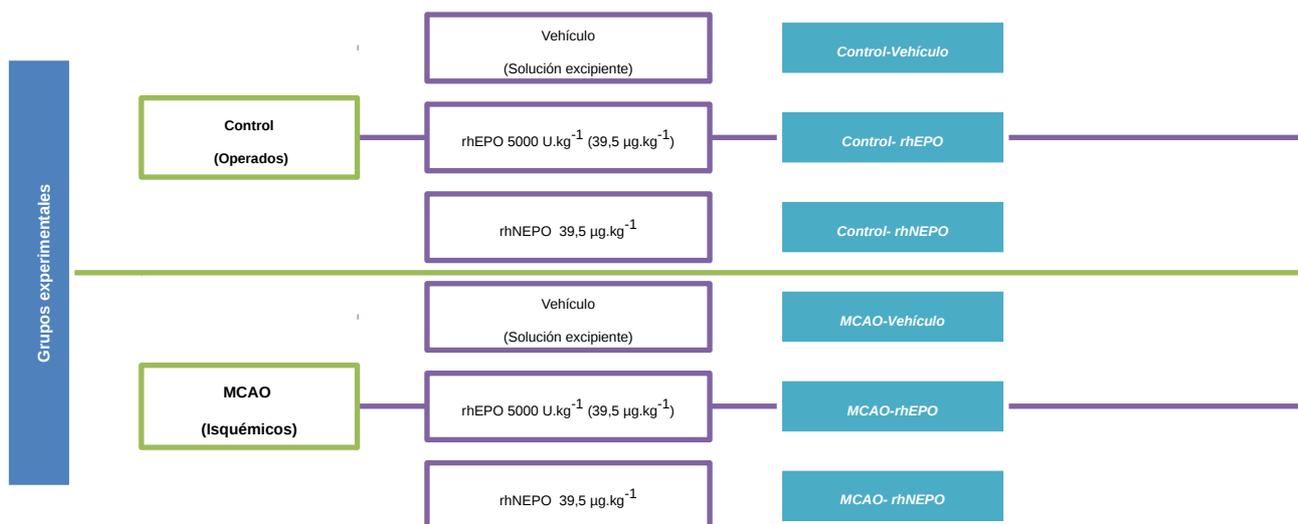


Fig. 20. Grupos experimentales.

En el esquema se observan los 6 tratamientos evaluados (rectángulos turquesas con letras en blanco) dentro de cada grupo (rectángulos blancos con bordes verdes).

Las moléculas empleadas fueron vehiculizadas con solución salina [NaCl 0,1% (P/V)] e inyectadas vía intraperitoneal. La dosis administrada fue de 39,5 µg.kg⁻¹ equivalente a 5000 U.kg⁻¹, que corresponde a la dosis reportada en varios estudios *in vivo* ([Brines y col., 2000](#); [Li y col., 2007b](#); [Velly y col., 2010](#); [Villa y col., 2007](#)) para este biofármaco. Los grupos que no recibieron las variantes de rhEPO fueron inyectados con el mismo volumen de solución excipiente diluida en solución salina.

26.3 Análisis de la actividad motora

Las pruebas de comportamiento se realizaron en una sala aislada en condiciones de iluminación y silencio constantes a lo largo de la prueba. Para eliminar las huellas olfativas dejadas por los ratones, el piso y las paredes de los equipos se limpiaron cuidadosamente antes de continuar con el siguiente animal.

26.3.1 Índice de déficit neurológico (IDN)

La evaluación del estado neurológico permite determinar cuán severo es el daño ocasionado en el animal de experimentación luego de provocarle una isquemia cerebral focal permanente ([Hatcher y col., 2002](#); [Longa y col., 1989](#)).

Esta prueba se realizó diariamente desde el día D1 (3 horas después de la MCAO).



Fig. 21. Respuesta alterada al reflejo posterior.

Adaptada de [Quinzaños-Fresnedo y col. \(2008\)](#).

Los hallazgos neurológicos se calificaron en una escala de cinco puntos:

0 - sin déficit neurológico,

1 - falla en la extensión de la pata izquierda (leve déficit neurológico focal) (Fig. 21),

2 - cuerpo encorvado a la izquierda (déficit neurológico focal moderado),

3 - cayendo a la izquierda (déficit focal severo),

4 - falta de movimientos espontáneos y disminución del nivel de conciencia.

Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM (n=10), siendo SEM el error estándar medio.

26.3.2 Evaluación de la fuerza de las extremidades delanteras

Esta prueba permite evaluar la capacidad de los animales para mantenerse suspendidos de una cuerda poniendo en evidencia la fuerza de las extremidades delanteras ([Hattori y col., 2000](#); [Li y col., 2004](#)).

Se realizó los días 0, 4 y 7 del tratamiento. Con este fin, los animales fueron suspendidos por sus extremidades delanteras en un alambre tendido entre 2 columnas a una altura de 60 cm por encima de una cama de viruta. Se registró el tiempo (en s) que cada animal se mantuvo suspendido y se consideró una puntuación desde cero (ratón que cayó de inmediato) hasta 120 s (período de suspensión máximo). Se realizaron 2 ensayos para cada ratón en cada día de prueba.



Fig. 22. Capacidad de agarre de las patas delanteras.
Adaptada de [Quinzaños-Fresnedo y col. \(2008\)](#).

26.3.3 Prueba del cilindro

La prueba del cilindro permite evaluar la asimetría en el uso de las extremidades anteriores durante la exploración vertical. Originalmente fue desarrollada para el estudio en ratas ([Brooks y Dunnett, 2009](#); [Hua y col., 2002](#); [Schallert y col., 2000](#)). Sin embargo, tiempo después fue adaptada para su aplicación en ratones ([Li y col., 2004](#)). Para el desarrollo de esta prueba el ratón se colocó en un cilindro transparente de 9 cm de diámetro y 15 cm de altura y fue filmado durante 5 min desde la parte superior del cilindro con el objeto de poder registrar todos los movimientos de las extremidades anteriores.

El criterio empleado para contabilizar los contactos de las extremidades con la pared del cilindro se describen a continuación:

- El primer contacto con una de las extremidades sobre la pared del cilindro cuando el ratón se elevó fue considerado un movimiento independiente.
- Cuando el ratón tuvo contacto con ambas extremidades simultáneamente al elevarse fue considerado sólo como un movimiento registrado como ambas.
- Cuando el animal en primer lugar tuvo contacto con una extremidad y luego apoyó la siguiente, se consideró un movimiento independiente y un movimiento con ambas.
- Cuando el ratón exploró la pared del cilindro con ambas extremidades alternando entre uno u otra también fue considerado como un movimiento de ambas.

Un total de 20 contactos se registraron durante la prueba. Dado que la MCAO de la ACM afecta la motricidad de las extremidades delanteras en forma cruzada, el

resultado se expresó como la relación entre el porcentaje de uso de la extremidad no afectada (derecha) el D7 y el porcentaje del uso el D0. Así como también se graficó el porcentaje de uso de cada extremidad en forma independiente o simultánea durante la exploración vertical.



Fig. 23. Prueba del cilindro

Adaptada de [Brooks y Dunnett \(2009\)](#).

26.3.4 Prueba de la esquina

Esta prueba podría detectar una combinación de asimetrías inducidas por isquemia cerebral, focal que incluyen sensibilidad de los bigotes, uso de las extremidades anteriores y posteriores y función motora postural ([Zhang y col., 2002](#)).

Esta actividad se llevó a cabo los días 0 y 7, colocando a cada ratón entre dos placas de 30x20 x1 cm (ver Fig. 24). Los bordes de las dos placas se unieron en un ángulo de 30 ° con una pequeña abertura a lo largo de la unión entre las dos juntas para fomentar la entrada en el rincón. El ratón se colocó entre las dos placas mirando hacia la esquina aproximadamente a mitad de camino. Al entrar profundamente en la esquina ambos lados del cuerpo son estimulados al tacto suave. El ratón llega al rincón y luego se levanta hacia adelante y hacia arriba, luego gira para ir hacia el final abierto. El ratón no isquémico no tiene preferencia de giro, pudiéndolo hacer para cualquiera de las direcciones (derecha o izquierda) mientras que el ratón con daño isquémico preferentemente lo hace hacia el lado ipsilateral a la MCAO (derecha).

Se registraron un total de diez giros para cada animal. El índice de lateralidad (IL) y el índice de lateralidad normalizado (ILN) fueron calculados como propone [Bouet y col. \(2007\)](#). El IL fue calculado para cada animal, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IL = \frac{D-I}{10} \quad (32)$$

Donde D es el número de giros hacia la derecha, I es el número de giros a la izquierda y 10 es el número total de giros registrados. El IL se calculó para el D0 y fue considerado como el índice basal (ILB) y el IL calculado para el D7 fue normalizado empleando la ecuación 33 ([Rynkowski y col., 2009](#)).

$$ILN = \frac{IL_{D7} + 2}{ILB + 2} \quad (33)$$

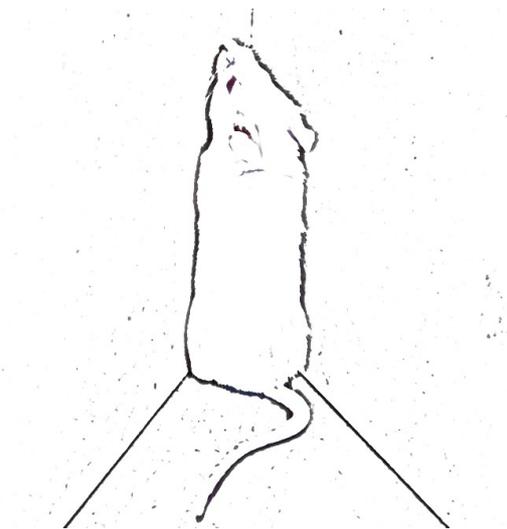


Fig. 24. Prueba de la esquina.

26.4 Controles de rutina

A los fines de evaluar si los tratamientos aplicados provocaban cambios en la conducta alimentaria de los animales, se realizaron dos controles de rutina:

- Control de la ingesta: se colocaron 10 *pellets* de alimento en la jaula de cada animal y al día siguiente se contabilizaron cuántos se habían ingerido. Este procedimiento se realizó diariamente desde el día D0.
- Control del peso: diariamente los animales se pesaron y se registró su peso desde el día D0.

26.5 Determinación del hematocrito

Para evaluar el efecto de las variantes de rhEPO sobre la producción de glóbulos rojos, luego de los tratamientos aplicados se realizó un microhematocrito. El hematocrito corresponde a la relación entre el volumen ocupado por eritrocitos y el correspondiente a la sangre total. Como los animales que se emplearon para los estudios conductuales no podían sufrir alteraciones se realizó este estudio con otra serie de ratones que recibieron el mismo tratamiento que los animales del modelo pero a los cuales no se les realizó ninguna cirugía.

Para ello, se emplearon 15 ratones Balb/c machos, de un mes de edad, con un peso promedio de 20-25 g (Bioterio de Esperanza, Argentina), los cuales fueron mantenidos en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad-libitum*. Los mismos fueron divididos en tres grupos experimentales (rhEPO, rhNEPO y Vehículo) con 5 animales cada uno.

Culminado el tratamiento, según Fig. 19, se utilizaron capilares no heparinizados de 75 mm de longitud y 1 mm de diámetro interior, los cuales se llenaron hasta las $\frac{3}{4}$ partes de capacidad con sangre obtenida de la vena retroorbital de cada animal. El extremo seco del tubo se cerró con plastilina y se colocó en una microcentrífuga radial (Bioamerican Science, Argentina) con el extremo cerrado dirigido hacia fuera. Se centrifugaron a 12.000 rpm durante 4 min.

Luego, se midió la relación entre la longitud de la columna de eritrocitos y toda la columna de plasma empleando un ábaco especial.

Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM para cada grupo (n=5) y el análisis estadístico se realizó aplicando el test ANOVA seguido del test de Tukey, considerando diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

26.6 Sacrificio de los animales y procesamiento de los cerebros

Transcurridos los 8 días del experimento, cada animal fue profundamente anestesiado con una dosis intraperitoneal de ketamina:xilacina (100 mg.kg⁻¹: 10 mg.kg⁻¹) y luego perfundido a través del ventrículo izquierdo ([Caltana y col., 2009](#)). Inicialmente, el animal se perfundió con 40 ml de una solución salina conteniendo heparina (Rivero, Argentina) 50 UI (como anticoagulante) y NaNO₂ (Merck) 0,05% (P/V) (como vasodilatador), y posteriormente con 40 ml de una solución fijadora que contenía PFA 4% (P/V) y glutaraldehído (J.T. Baker) 0,25 % (V/V) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,2 (BF). Los cerebros fueron retirados del cráneo y mantenidos en la misma solución fijadora durante 2 horas a 4°C, posteriormente se lavaron tres veces en BF y se conservaron en una solución de sacarosa (Merck) 5 % (P/V) en BF durante 18 h a 4 °C.

Finalmente, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 50 μ m de espesor empleando un vibrátomo (Vibratome 1000Plus, Vibratome®, EE.UU.), en series de 15, y se criopreservaron en una solución de glicerol al 50 % (V/V) en PBS a -20 °C hasta su análisis.

26.7 Inmunohistoquímica

Con el fin de evaluar los distintos cambios bioquímicos y morfológicos ocurridos en los cerebros de los animales sometidos a la isquemia cerebral focal permanente y a los cuales se les aplicaron distintos tratamientos se realizaron una serie de inmunomarcaciones empleando diferentes anticuerpos.

En cada uno de los experimentos de IHQ el procedimiento técnico fue el mismo. En todo momento, los cortes de cerebro de cada uno de los grupos experimentales se procesaron en flotación libre, simultáneamente, en condiciones estandarizadas (para cada inmunomarcador, en el mismo momento, el mismo día) ([Evrard y col., 2006](#)).

El primer paso realizado tuvo como finalidad inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, para lo cual las secciones de tejidos fueron tratadas con H₂O₂ 0,5% (V/V) en PBS 1X durante 30 min. Luego se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante 1 h en una solución conteniendo SNO 3% (V/V) y Tritón X-100 0,5 % (V/V) en PBS (Solución de bloqueo) para bloquear los sitios de unión inespecíficos y en forma simultánea permeabilizar los tejidos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS 1X y se incubaron 3 h a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4 °C en presencia de los anticuerpos primarios dirigidos contra los distintos marcadores a estudiar en cada caso particular, diluidos con solución diluyente [SNC 1% (v/v) y Tritón X-100 0,3% (v/v) en PBS 1X] en las siguientes proporciones:

- Anticuerpo monoclonal anti-MAP2 (Sigma) 1:1000
- Anticuerpo policlonal anti-GFAP (DAKO, EE.UU.) 1:3000
- Anticuerpo monoclonal anti-NF-200 (Sigma) 1:1000

Transcurrido ese tiempo, los cortes se lavaron cinco veces con PBS 1X y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios biotinilados anti-IgG de ratón (Sigma) o de conejo (Sigma), dependiendo del anticuerpo primario. En todos los casos, la dilución fue 1:500 empleando la solución diluyente.

Una vez finalizada esta incubación, se lavaron nuevamente los cortes y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 min con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Sigma) diluido 1:500.

Seguidamente, se lavaron los cortes 2 veces con PBS 1X y 2 veces con *buffer* de acetato 0,1 M, pH 6,0 (BA). A continuación, se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina 0,035% (P/V) (DAB, Sigma) y sulfato amónico de níquel (Sigma) 2,5% (P/V) en BA.

El revelado se llevó a cabo con el agregado de H₂O₂ 0,1% (V/V) agitando hasta observación de color. Luego, los cortes se lavaron con BA 3 veces y 1 vez con agua destilada.

Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se los deshidrató por desecación al aire y se los cubrió con un cubreobjeto utilizando el medio de montaje Permount™ (Fisher, EE.UU.).

26.8 Determinación del volumen de infarto

Con el objeto de determinar el volumen del tejido infartado, los cortes se lavaron dos veces con PBS 1X y montaron sobre portaobjetos gelatinizados se dejaron secar al aire y se colorearon aplicando la coloración de Nissl. Para ello, se cubrieron las secciones con una gota de la solución de coloración [azul de toluidina (Merck) 0,1% (P/V) y Na₂CO₃ (Merck) 1,25% (P/V) en agua destilada], durante 20 a 30 s para obtener una tinción suave, e inmediatamente se lavaron suavemente con agua destilada y, en caso de que la coloración fuese demasiado oscura, se aclaró con alcohol 96°. Finalmente, se secaron al aire y se los cubrió con medio de montaje Permount™ y un cubreobjetos.

Para obtener las imágenes en forma digital se escanearon empleando el *scanner ImageScanner* (GE Healthcare) y se empleó el editor de imágenes *Adobe PhotoShop* (Adobe, Irlanda). El área de infarto en cada sección del cerebro fue calculada empleando el programa *ImageJ* (NIH, EE.UU.) calibrando previamente los píxeles correspondientes a una unidad milimétrica. Para cada animal, la cavidad fue medida en 2-5 secciones, separadas aproximadamente por 750 μm. Esta distancia es el resultado del producto entre el espesor del corte (50 μm) por el número de series (en este caso 15). El área de infarto de cada sección se calculó sustrayendo el área calculada para el hemisferio ipsilateral a la del hemisferio contralateral. Finalmente el volumen de infarto se obtuvo empleando la siguiente ecuación (34):

$$V_i = d \cdot \sum_{1}^n (A_c - A_i) \quad (34)$$

donde d es la distancia (0,075 mm), A_c es el área (mm²) del hemisferio contralateral, A_i el área del hemisferio ipsilateral y n es el número total de secciones evaluadas para cada animal.

26.9 Captura de imágenes digitales

Las secciones teñidas con la técnica de IHQ se fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia Axiophot (Zeiss) acoplado con una cámara digital (Olympus Qcolor5) y con un microscopio de epifluorescencia Axiolab (Zeiss) acoplado con una cámara digital (Olympus Qcolor3).

Todas las secciones de una determinada inmunomarcación fueron fotografiadas en paralelo, manteniendo las mismas condiciones de luminosidad y tiempo de exposición para todos los grupos experimentales. Cada campo microscópico fue seleccionado dentro de los límites de la zona anatómica de interés para ser analizada morfométricamente. Se fotografiaron 3 campos por área cerebral en cada corte de cada animal. Las áreas estudiadas fueron la región CA1 del hipocampo y la corteza ubicada por encima de dicha región.

26.10 Análisis morfométrico de las imágenes digitales

Para el análisis de las imágenes se emplearon los programas *ImageJ* e *Image Pro Plus 5.1*.

Según el tipo de marcación realizada la cuantificación fue diferente. A continuación se presentan las que se utilizaron en este trabajo:

- Cuantificación del área relativa de fibras: se midió el área relativa de las fibras MAP2, NF-200 y se relacionó al área total del campo microscópico correspondiente al aumento 20 X. Expresando el resultado como superficie relativa.
- Cuantificación del área relativa celular: se midió el área relativa de las células GFAP positivas (Evrard y col., 2006) y se relacionó al área total del campo microscópico correspondiente al aumento 20 X. Expresando el resultado como superficie relativa.

26.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos fueron realizados empleando el programa *GraphPad Prism*. Los valores se presentan como el promedio \pm SEM (n=10, para las pruebas conductuales y n=5 para IIHQ). La comparación fue realizada empleando el análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA), seguido del test de Student-Neuman-Keuls o Bonferroni, respectivamente, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

"La gran victoria que hoy
de pequeñas victorias c

P. Coeino



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PURIFICACIÓN DE UNA NUEVA VARIANTE DE rhEPO

La utilización de células animales para la producción de proteínas terapéuticas es de suma importancia cuando la molécula de interés es una glicoproteína, ya que este sistema permite obtener perfiles de glicosilación similares a los presentes en las proteínas humanas.

Sin embargo, para la purificación de dichas moléculas hay que tener en cuenta la composición del medio de cultivo utilizado, el nivel de expresión de la proteína, su costo y mercado, la calidad requerida (siempre elevada por tratarse de proteínas para uso parenteral en humanos) y las técnicas de purificación desarrolladas. Todas estas variables afectan tanto el rendimiento final como el costo del proceso.

En la industria farmacéutica la estrategia de purificación típica consiste en cuatro fases o estadios generales que abarcan la remoción de componentes insolubles, la fase de captura, la fase de purificación intermedia y la fase de purificación final ([Belter y col., 1988](#)).

Teniendo en cuenta esto, el proceso de purificación planteado para la obtención de una nueva variante de rhEPO contempló las cuatro fases. El primer paso, que consiste en la remoción de componentes insolubles, se realizó de sometiendo el sobrenadante de cultivo obtenido a partir del reactor a un sistema de filtración empleando cartuchos de tamaño de poro variable. En este punto, se lograron eliminar los agregados y detritos celulares, permitiendo el correcto acondicionamiento de la muestra para ser sometida a la siguiente etapa. Es importante destacar que se obtuvieron 18 l de clarificado conteniendo 900 mg de la proteína de interés, con un porcentaje de pureza del 22%, que resulta elevado considerando que se obtuvo a partir de un cultivo de células animales. Esto, en parte, puede ser explicado por la baja proporción de SFB empleado para la suplementación del medio de cultivo, y por el alto nivel de producción del clon celular.

En las fases subsiguientes, para alcanzar el producto deseado se llevaron a cabo cuatro pasos cromatográficos.

El primero de ellos consistió en una columna cromatográfica de pseudoafinidad usando una matriz basada en la inmovilización del colorante triazínico *Cibacron Blue*, que permitió la captura de la población completa de isoformas de rhEPO secretadas al medio de cultivo por las células CHO.K1 productoras y, al mismo tiempo, la eliminación de un alto número de impurezas. En la Fig. 25 se presenta el perfil cromatográfico obtenido a partir del empleo de la mencionada matriz.

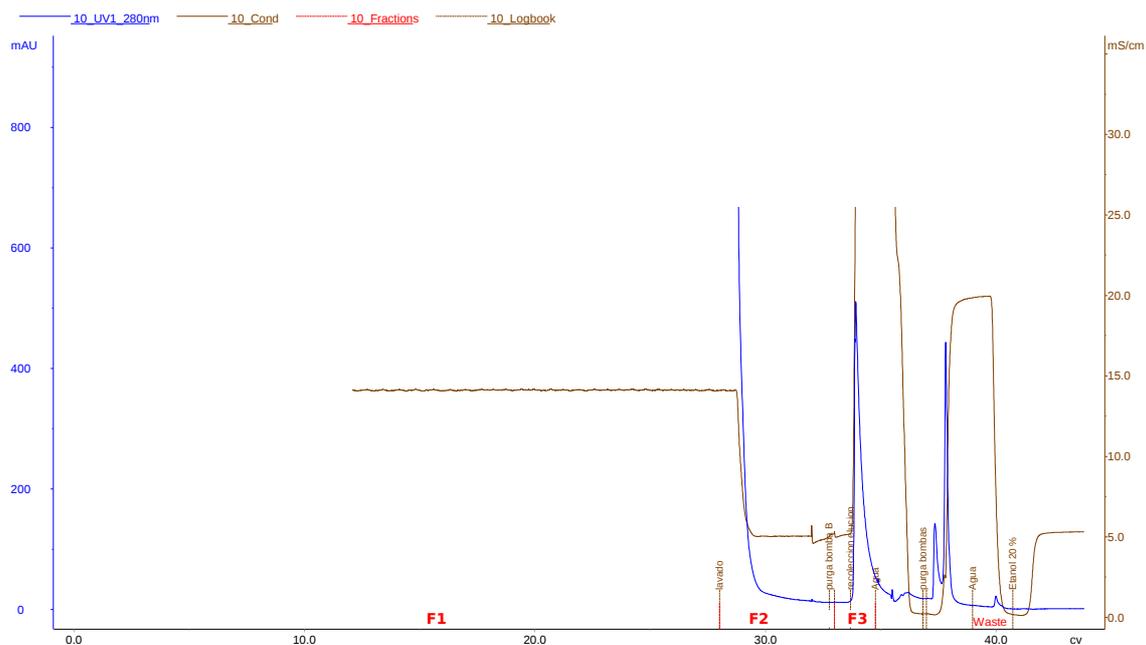


Fig. 25. Perfil cromatográfico obtenido para la cromatografía de pseudoafinidad.

En azul se grafica la absorbancia ($\lambda=280$ nm) y en marrón la conductividad del efluente. Las líneas rojas indican un cambio de etapa en el protocolo de purificación.

El principal contaminante eliminado fue la BSA proveniente del SFB utilizado como suplemento del medio de cultivo, ya que pudo ser parcialmente separada de la población de isoformas de rhEPO debido a su diferente carga a pH 7 y a la contribución diferencial de otras fuerzas de unión de naturaleza no electrostáticas. Como se puede observar en la Fig. 25 al inicio de la siembra una gran población de proteínas contaminantes fueron incapaces de unirse a la columna, lo cual se reflejó en el marcado incremento de la absorbancia en la fracción F1. Por otra parte, el pico observado en la fracción F3 correspondió a la elución de la proteína de interés.

Dado que las condiciones cromatográficas empleadas no fueron suficientemente selectivas como para separar poblaciones de isoformas de EPO, se obtuvieron 900 ml de eluato concentrado y diafiltrado conteniendo una mezcla de 15 isoformas de EPO que contienen entre 0 y 14 moléculas de ácido siálico (Fig. 29B, calle 2) con un alto porcentaje de recuperación (85%) y un incremento de la pureza en un factor de 3,23 alcanzando un aceptable nivel de pureza (71%) (Tabla 2).

El segundo paso cromatográfico, que forma parte de la primera etapa de purificación intermedia, fue introducido como una operación clave en el proceso ya que permitió obtener, por un lado, una población de glicoisofomas de rhEPO apropiada para el tratamiento de anemias y, por otro, la nueva combinación propuesta para terapias citoprotectoras. Para ello, se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico

que, además de permitir la separación de estas dos poblaciones de glicoisofomas de rhEPO, fue útil para eliminar contaminantes no proteicos tales como ADN. En la Fig. 26 se presenta el perfil cromatográfico obtenido para este paso de purificación.

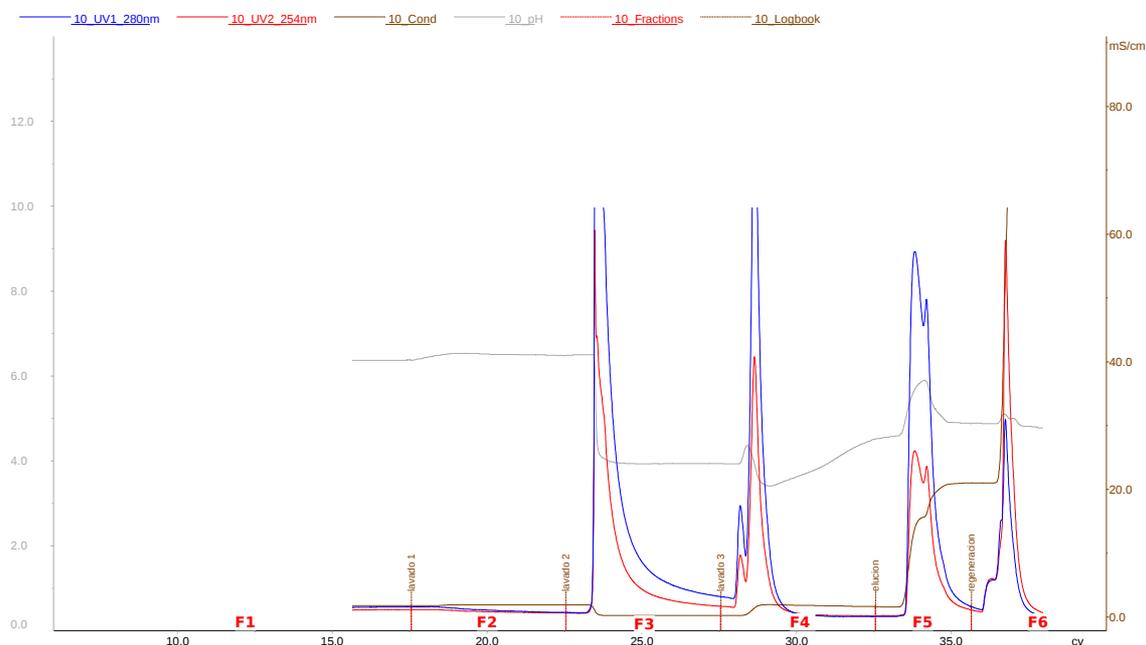


Fig. 26. Perfil cromatográfico obtenido para la columna columna *Q-Sepharose Big Bead*.

En azul y rojo se grafican las absorbancias del efluente a $\lambda=280$ nm y 254 nm, respectivamente. En marrón y gris se grafican la conductividad y el pH. Las líneas verticales rojas indican un cambio de etapa en el protocolo de purificación.

En esta oportunidad, el volumen del eluato obtenido en la fase de captura fue sembrado en una columna de *Q-Sepharose Big Bead* a pH 6,5. A dicho pH todas las isoformas de EPO se encuentran cargadas negativamente por lo que en su mayoría fueron adsorbidas a la matriz. Luego se eluyeron las isoformas de interés (aquellas menos ácidas) mediante disminución del pH. La primera fracción (F3) obtenida luego de esta disminución fue descartada por contener proteínas provenientes del SFB empleado para suplementar el medio de crecimiento de las células mientras que la fracción F4 constituyó el producto de interés (Fig. 26). Este paso, generó un rendimiento total del 42% (Tabla 2), lo cual era esperable ya que un alto número de isoformas (más ácidas) quedaron retenidas en la matriz y debieron ser eluidas efectuando lavados con una solución de alta fuerza iónica (F5, Fig. 26). De este modo, este paso de purificación permitió separar selectivamente dos poblaciones de glicofomas de rhEPO con propiedades fisicoquímicas diferentes, unas más ácidas y

otras menos ácidas dado el inferior contenido de ácido siálico terminal (Fig.29B, calles 3 y 4).

La pureza alcanzada en este paso fue del 80% (Tabla 2). A pesar de haberse incrementado con respecto a la etapa previa, aún se hallaba presente una banda de masa molecular similar a la de la BSA en el eluato (Fig. 29A, calle 5). Por este motivo, se llevó a cabo un paso adicional de purificación intermedia empleando una cromatografía de intercambio aniónico *Q-Sepharose Fast Flow* equilibrada a pH 5. En la Fig. 27 se presenta el perfil cromatográfico obtenido en este paso de purificación.

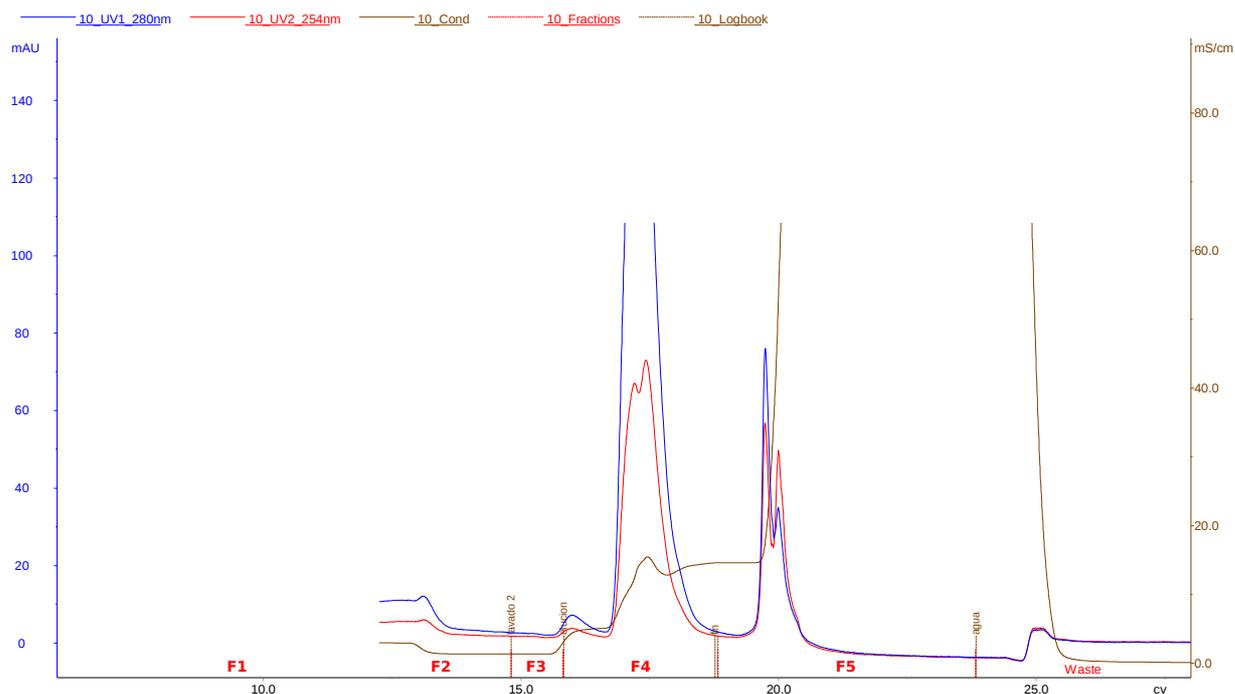


Fig. 27. Perfil cromatográfico obtenido para la columna *Q-Sepharose Fast Flow*.

En azul y rojo se grafican las absorbancias a $\lambda=280$ nm y 254 nm, respectivamente. En marrón se grafica la conductividad de la muestra y las líneas verticales rojas indican un cambio de etapa en el protocolo de purificación.

En esta condición todas las isoformas presentes en la siembra se unieron a la matriz, mientras que la BSA no quedó retenida debido a que prácticamente tiene carga nula al mencionado pH. Posteriormente, mediante un incremento de la fuerza iónica se realizó la elución de la población de isoformas retenidas en la matriz (F4, Fig. 27) sin evidenciar cambios en su composición. Sin embargo, se mejoró significativamente la pureza (88%, Tabla 2) al remover las trazas de BSA y ADN presentes en el producto.

Por lo tanto, esta fase de purificación intermedia permitió obtener en el primer paso cromatográfico una fracción más ácida, con un patrón de glicoisformas

comparable al de la rhEPO empleada en tratamientos de anemias (Fig. 29B, calles 4 y 8) y, por otro lado, una fracción menos ácida que luego de ser sometida a un segundo paso cromatográfico fue denominada *Neuroepoetin* (rhNEPO) debido a su similitud en masa molecular a la EPO producida por cultivo primario de células de cerebro de rata (Masuda y col., 1994) y por células astrocíticas del mismo origen (Masuda y col., 1999) (Apartado 2.1). Por consiguiente, este protocolo de purificación resulta una estrategia atractiva y de bajo costo para la obtención simultánea de derivados de rhEPO con diferentes propósitos terapéuticos, que constituye el objetivo de estudio del presente trabajo de tesis.

Por último, se realizó una purificación final empleando una cromatografía de fase reversa por HPLC-C4, con la finalidad de remover dímeros, productos relacionados de elevada masa molecular y vestigios de proteínas derivadas de la célula huésped. En la Fig. 28 se presenta el perfil cromatográfico obtenido en esta última etapa.

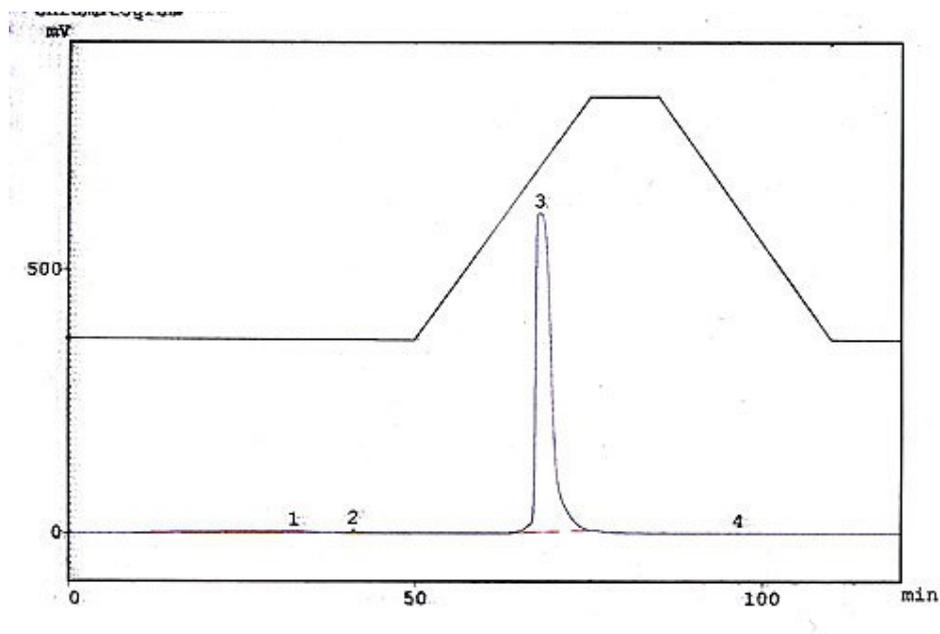


Fig. 28. Perfil cromatográfico obtenido para la columna HPLC-C4.

En azul se grafica la absorbancia ($\lambda=280$ nm) y en negro se representa el gradiente empleado. Los picos 1 y 2 corresponden a impurezas, mientras que el pico 3 corresponde a rhNEPO monomérica.

Este paso permitió alcanzar una pureza final elevada del 99,4% (Tabla 2), acorde a los requerimientos establecidos para compuestos biofarmacéuticos. Es importante destacar que el porcentaje de pureza determinado mediante HPLC-C4 difiere del calculado por el cociente entre la masa de EPO y las proteínas totales

debido a que dichas determinaciones fueron realizadas por diferentes métodos (HPLC-C4 y Método de Bradford).

El producto obtenido luego de este último paso de purificación se sometió a un cambio de *buffer* y se lo acondicionó en solución excipiente para mantener su estabilidad, conformando de esta manera el lote final de rhNEPO. Este cambio no afectó la composición de isoformas presentes (Fig. 29 B, calle 7).

En la Fig. 29 se muestra el análisis por SDS-PAGE e IEF de los diferentes productos obtenidos luego de cada etapa de purificación.

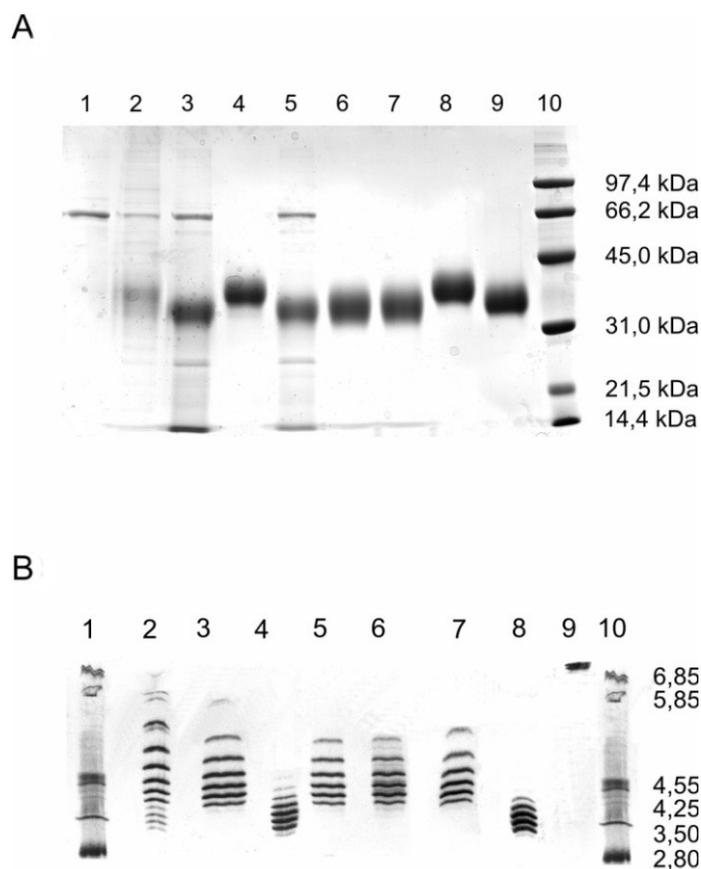


Fig. 29. Análisis del proceso de purificación de rhNEPO mediante SDS-PAGE (A) e IEF (B).

Los diferentes productos obtenidos luego de cada paso de purificación así como los lotes finales de rhNEPO y rhEPO estándar fueron analizados por SDS-PAGE (A) y por IEF (B).

Calle 1: sobrenadante de cultivo (A) y marcador de punto isoeléctrico (pI) (Serva, Alemania) (B), Calle 2: elución de la *Blue Sepharose* (isoformas totales), Calle 3 y 4: picos de proteínas eluidos de la *Q-Sepharose Big Beads* (isoformas menos y más ácidas, respectivamente), Calle 5: elución de la *Q-Sepharose Fast Flow*, Calle 6: elución de la HPLC-C4, Calle 7: lote final de rhNEPO, Calle 8: lote de rhEPO (Zelltek, S.A.), Calle 9: EPO desialidada, Calle 10: Marcador de masa molecular (BioRad) (A) y marcador de pI (B).

En la Tabla 2 se resumen todos los parámetros cromatográficos obtenidos para cada etapa de purificación y, como se puede observar, el rendimiento global del proceso fue del 33% con un factor de purificación neto de 4,52; si bien este valor es bajo se debe tener en cuenta que se partió de una muestra cuyo nivel de pureza era superior al 20%.

Tabla 2. Parámetros de purificación de proceso completo

Etapas	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)	rhEPO Total (mg)	Pureza* (%)	FP	R (%)
<i>Remoción de componentes insolubles</i>	18.000	4.100	900	22	-----	100
<i>Blue Sepharose¹</i>	900	1.090	765	71	3,23	85
<i>Q-Sepharose Big Beads²</i>	400	477	382	80	1,13	42
<i>Q-Sepharose Fast Flow²</i>	300	391	344	88	1,10	38
<i>HPLC-C4³</i>	185	300	293	99,4	1,13	33

¹ Cromatografía de afinidad a colorantes.

² Cromatografía de intercambio iónico.

³ Cromatografía de fase reversa.

* determinada por HPLC-C4.

27. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE rhEPO

La caracterización fisicoquímica de toda proteína es muy importante ya que permite definir y relacionar las propiedades asociadas a la misma.

En esta oportunidad, la nueva combinación de glicoisofomas (rhNEPO) fue caracterizada fisicoquímicamente en forma comparativa con la rhEPO empleada como droga hematopoyética y con la rhEPO cuyas moléculas de ácido siálico fueron removidas por acción enzimática (rhAEPO).

27.1 Evaluación de la masa molecular

En primer lugar, se determinó la masa molecular aparente mediante SDS-PAGE y, como se observa en la Fig. 30, todas las variantes estudiadas se visualizan como una banda ancha consistente con la heterogenidad de isoformas presentes en cada muestra. En cuanto a la rhNEPO, se observa un masa molecular aparente comprendida en un rango entre 30,8 y 38,0 kDa cuyo valor medio es de 34,4 kDa, siendo éste menor al de la rhEPO (37,1 kDa) cuya masa molecular aparente está comprendida entre 33,7 y 40,4 kDa.

Como se puede observar, existe una zona en la que las bandas correspondientes a estas moléculas se superponen, indicando que comparten algunas

isoformas de igual tamaño. Sin embargo, la rhNEPO presenta isoformas de menor tamaño que están ausentes en la combinación hematopoyética, y ésta, a su vez, presenta en su composición isoformas de mayor masa molecular que no se hallan en la nueva combinación. Esta diferencia es claramente visualizada si se tiene en cuenta el valor medio de masa molecular aparente de cada variante de rhEPO ya que se observa una diferencia de 2,7 kDa, imitando las diferencias observadas entre la hormona secretada por un cultivo primario de células del cerebro de rata bajo condiciones de hipoxia comparada a la circulante en el suero de la rata ([Masuda y col., 1994](#)). Además, la rhNEPO evidenció un tamaño medio muy similar al de la rhAEPO, cuya masa aparente oscila entre 31,8 y 38,0 kDa, con un valor medio de 34,9 kDa.

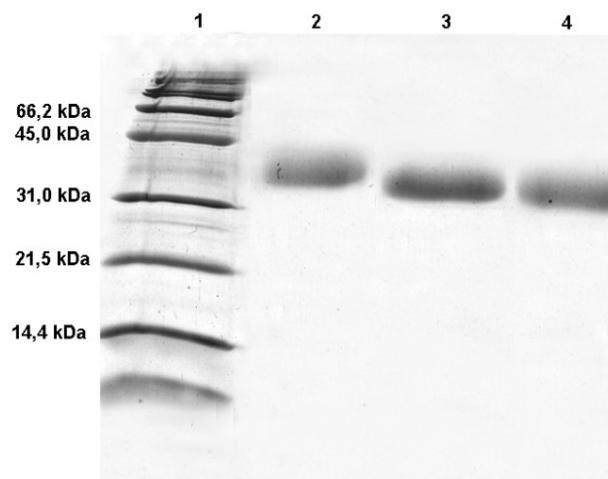


Fig. 30. Determinación de la masa molecular aparente de las variantes de rhEPO mediante SDS-PAGE.

Las distintas variantes de rhEPO se sembraron en un gel de SDS-PAGE al 12% (P/V) y se colorearon con *Coomasie Brilliant Blue*. Calle 1: marcador de masa molecular (BioRad), Calle 2: rhEPO, Calle 3: rhAEPO y Calle 4: rhNEPO.

Con el fin de corroborar si las diferencias observadas principalmente entre la rhNEPO y la rhEPO realmente existían, se realizó la determinación de la masa molecular de manera precisa mediante MALDI-TOF. En esta oportunidad, la masa molecular promedio de la rhEPO fue de 29,3 kDa, como era esperable teniendo en cuenta la masa molecular conocida de la rhEPO de referencia α/β ([Llop y col., 2008](#)), mientras que la masa molecular de la rhNEPO fue de 26,4 kDa. De este modo, la nueva variante presentó una diferencia con la rhEPO de 2,9 kDa, comparable con la obtenida cuando se determinó mediante SDS-PAGE. Por otro lado, la rhAEPO presentó una masa molecular promedio de 26,1 kDa, siendo muy similar a la de la rhNEPO, tal como se había observado mediante la técnica de SDS-PAGE. Por lo tanto, dato que la rhAEPO carece de ácidos siálicos terminales pero presenta una

masa molecular similar a la de la nueva variante, se puede inferir que estas diferencias en la masa molecular podrían no sólo estar relacionadas con el contenido de ácido siálico sino también con la estructura de los carbohidratos unidos a la proteína.

27.2 Evaluación de la glicosilación

La glicosilación es una de las más importante modificaciones post-transcripcionales presente en la mayoría de las proteínas recombinantes utilizadas como bioterapéuticos. Constituye uno de los atributos críticos de calidad que requiere un análisis minucioso para garantizar la seguridad y eficacia del producto, ya que tiene un marcado efecto sobre diversas propiedades biológicas de dichas proteínas que pueden afectar su solubilidad, estabilidad, antigenicidad, inmunogenicidad, actividad biológica, interacción entre células, farmacocinética y vida media en plasma ([Delorme y col., 1992](#); [Dubé y col., 1988](#); [Narhi y col., 1991](#); [Sola y Griebenow, 2010](#)). La glicosilación no sólo contempla las estructuras oligosacáridicas unidas a la proteína sino también el contenido de ácido siálico presente en la molécula.

Dado que para el caso de la rhEPO, las estructuras prioritarias que confieren mayor heterogenidad a la molécula son los oligosacáridos de tipo N unidos, se realizó sólo el estudio de estos carbohidratos (nativos y neutros) presentes en la rhNEPO y la rhEPO mediante HPAEC-PAD. Una vez obtenidos los cromatogramas con los picos correspondientes, se realizó la integración manual de los mismos y los resultados se expresaron como porcentaje de cada estructura presente en la muestra (Tabla 3).

Para el caso de los oligosacáridos nativos, los picos integrados fueron identificados considerando sus tiempos de retención en comparación con las estructuras estándares empleadas. Las estructuras oligosacáridicas identificadas en cada muestra se agruparon de acuerdo con su carga (número de moléculas de ácido siálico terminal: por ejemplo, el grupo disialidades comprende los oligosacáridos que presentan dos moléculas de ácido siálico terminal). Dentro de cada grupo mono-, di-, tri- y tetra-sialidades también se discriminó la antenaridad.

En la Fig. 31 se observan los perfiles cromatográficos obtenidos para la nueva variante y la rhEPO estándar cuando se analizó la composición de los oligosacáridos nativos. Como se puede observar claramente, la rhNEPO está enriquecida en glicanos neutros, mono-, di- y tri-sialidades (81,4 %), comparada con la rhEPO (30 %). Además, el contenido de oligosacáridos tetrasialidades fue mucho menor que en la rhEPO (13,6 y 58,1%, respectivamente).

Al comparar el nivel de ocupación con ácido siálico terminal y la ramificación de las estructuras, se puede ver que la rhNEPO presenta mayor porcentaje de estructuras ramificadas con sitios libres de ácido siálico que la rhEPO, principalmente si se tienen en cuenta las estructuras tri- y tetrasialidades.

Tabla 3. Análisis cuantitativo de las estructuras oligosacáridicas neutras o sializadas de la rhEPO y rhNEPO luego del estudio mediante HPAEC-PAD.

Estructuras		rhNEPO (%)	rhEPO (%)
Oligosacáridos Nativos	Neutras	1.9	0.2
	Monosialidades	17.6	0.4
	Disialidades	31.7	7.4
	Diantenarias	56.8	85.1
	Tri/Tetraantenarias	43.2	14.9
	Trisialidades	30.2	22.0
	Triantenarias	37.4	63.6
	Tri+1R/Tetraantenarias	62.6	36.4
	Tetrasialialidades	13.6	58.1
	Tetraantenarias	58.9	62.0
	Tetraantenarias + 1-2-3-R	41.1	38.0
	Otras estructuras^{&}	5.0	11.9
Oligosacáridos Neutros	Diantenarias	11.5	5.3
	Triantenarias	37.5	18.1
	Tetraantenarias	40.9	58.1
	Otras estructuras[*]	10.1	18.5

R: repeticiones de N-acetyl-lactosamina.

[&] Estructuras pentasialidades, sulfatadas y fosforiladas.

^{*} Estructuras monosialidades, sulfatadas y fosforiladas.

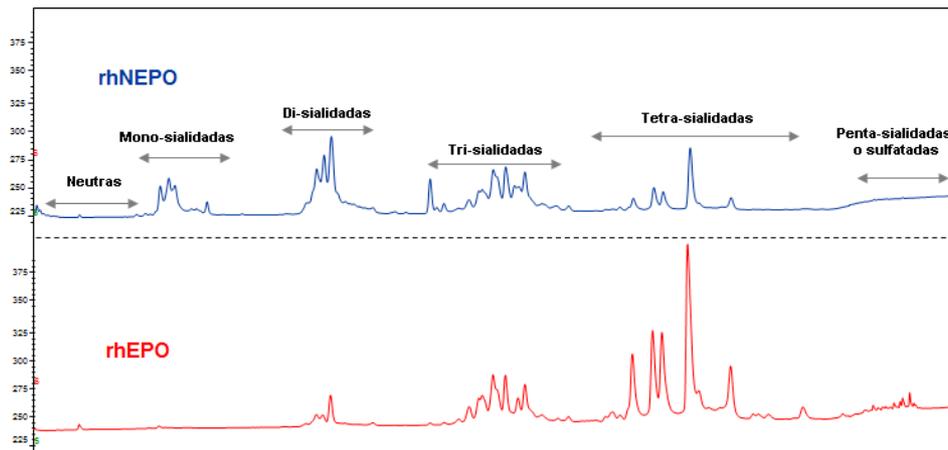


Fig. 31. Composición de oligosacáridos tipo N nativos.

Se observan los cromatogramas obtenidos para la rhNEPO (azul) y la rhEPO (rojo) al aplicar la metodología de HPAEC-PAD para analizar la estructura de los oligosacáridos tipo N nativos.

Con el fin de completar el estudio, se determinaron los oligosacáridos neutros. Para ello, ambas muestras debieron ser completamente desializadas antes de ser inyectadas a la columna cromatográfica. Una vez obtenidos los diferentes picos, los mismos fueron integrados e identificados de la misma manera que los oligosacáridos nativos pero en esta oportunidad las estructuras oligosacáridicas identificadas se agruparon de acuerdo con su antenaridad (número de antenas: por ejemplo, el grupo diantenarios comprende los oligosacáridos que presentan dos ramas o antenas). Dentro de los grupos de oligosacáridos diantenarios, triantenarios y tetraantenarios se identificaron subestructuras (estructuras con o sin unidades repetidas de N-acetilglucosamina).

En la Fig. 32 se observan los perfiles cromatográficos obtenidos para los oligosacáridos neutros. Como se puede ver, la rhNEPO exhibió mayor porcentaje de estructuras di- y triantenarios que la rhEPO (49,0 y 23,4%, respectivamente), mientras que la rhEPO presentó mayor proporción de oligosacáridos tetraantenarios (58,1% comparado con 40,9% de la rhNEPO).

Estos datos confirman que la diferencia observada en la masa molecular de ambas moléculas no sólo se debía al contenido de ácido siálico sino también a la estructura de la ramificación exhibida por los oligosacáridos tipo N unidos.

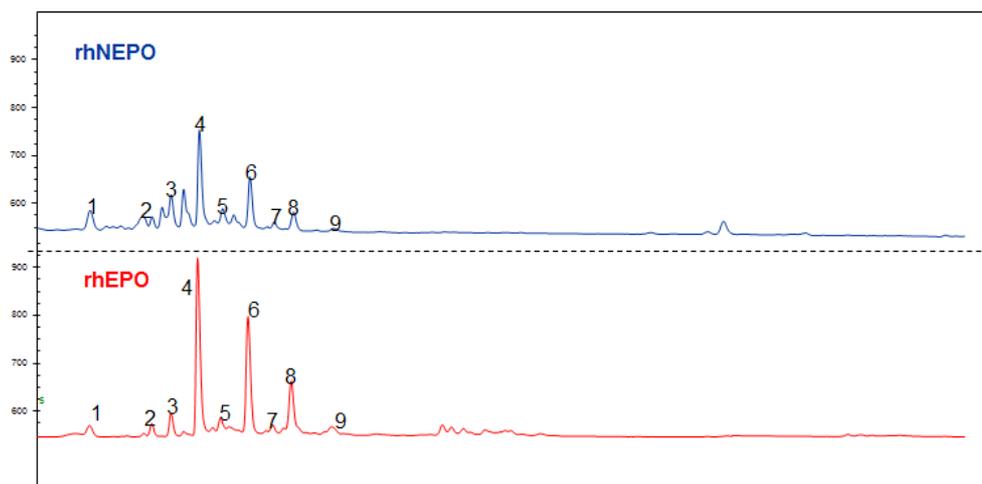


Fig. 32. Composición de oligosacáridos tipo N neutros.

Se observan los cromatogramas obtenidos para la rhNEPO (azul) y la rhEPO (rojo) al aplicar la metodología de HPAEC-PAD para analizar la estructura de los oligosacáridos tipo N neutros. (1): diantenaria, (2): triantenaria (2/4 ramificaciones), (3): triantenaria (2/6 ramificaciones), (4): tetraantenaria, (5): triantenaria + 1R, (6): tetraantenaria + 1R, (7): triantenaria + 2R, (8): tetraantenaria + 2R y (9): tetraantenaria + 3R. Los picos adicionales no asignados en la figura corresponden a formas truncadas de las estructuras di-, tri- y tetraantenarias.

Si bien a la rhAEPO no se le aplicó este análisis, cabe destacar que como se obtuvo por remoción únicamente de los ácidos siálicos terminales, las ramificaciones presentes serían las que se observaron para la rhEPO a la cual se le realizó el análisis de estructuras neutras. Por lo tanto, esto permitiría explicar la similitud observada en la masa molecular con la rhNEPO, si se considera que la rhEPO presentó un 17% más de estructuras tetraantenarias y un 25,6% menos de estructuras di- y tri-antenarias que la nueva combinación de isoformas. Es decir, se observó una compensación entre la ausencia de ácido siálico y la mayor proporción de estructuras ramificadas en la molécula de rhAEPO.

Por otro lado, se llevó a cabo el método de Peryodato-Resorcinol con el fin de evaluar el contenido de ácido siálico presente en cada variante y compararlo con el estudio de los oligosacáridos nativos y neutros. Los resultados obtenidos se calcularon en función de un estándar de ácido siálico y se expresaron como moles de AS por mol de proteína.

El valor obtenido para la rhNEPO fue de $8,0 \pm 1,0$ mol AS.(mol de proteína)⁻¹, el cual fue significativamente diferente al de la rhEPO [$12,9 \pm 1,0$ mol AS.(mol de proteína)⁻¹], representando el 62% del CAS de la hormona hematopoyética. Esta característica es la principal diferencia con respecto a la Neuro-EPO que sólo presenta menos del 40% ([García Rodríguez y Sosa Teste, 2009](#)). Estos resultados se

correlacionan con el menor tamaño molecular observado para la rhNEPO y su enriquecimiento con estructuras de glicanos con reducida antenaridad (estructuras di- y triantenarias) así como también con la pérdida de ácido siálico en la mayoría de las estructuras ramificadas de tipo tetraantenarias (Tabla 3).

El contenido de ácido siálico determinado para la molécula completamente desialidada (rhAEPO) fue prácticamente nulo [$0,7 \pm 0,3$ mol AS.(mol de proteína)⁻¹], lo que corrobora la idea de que la similitud en la masa molecular observada entre la rhNEPO y la rhAEPO no sólo está relacionada al contenido de ácido siálico sino también depende de las estructuras de las ramificaciones de los carbohidratos presentes en las moléculas.

27.3 Evaluación de las isoformas presentes

Con el fin de evaluar la heterogeneidad de las variantes de rhEPO, íntimamente relacionada con los oligosacáridos unidos y el contenido de ácido siálico terminal, las muestras se examinaron mediante IEF para determinar la composición de isoformas presentes (Fig. 26B).

En la muestra de rhNEPO se detectaron siete isoformas con pI aparente comprendido entre 4,2 y 6,1, mientras que el perfil de isoformas observado para la rhEPO fue marcadamente diferente, conteniendo seis glicofomas comprendidas en un rango de pI más ácido (3,0-4,2). Por lo tanto, la rhNEPO está conformada por las isoformas menos ácidas secretadas al medio de cultivo, las que en el proceso de producción industrial de la droga hematopoyética son descartadas. Esta observación es relevante, ya que como se comentó anteriormente, partiendo de un mismo proceso de producción se podrían obtener dos combinaciones de glicoisofomas de rhEPO con un propósito terapéutico diferente. Asimismo, esta población fue diferente a la reportada para la Neuro-EPO, que está conformada por un total de 13 isoformas con un pI comprendido entre 3 y 5 ([García Rodríguez y Sosa Teste, 2009](#)).

Para realizar un estudio cuantitativo más preciso de estas subpoblaciones se llevó a cabo el análisis mediante ECZ. En la Fig. 33 se presentan los electroferogramas obtenidos a pH 7,5 para la rhEPO y la rhNEPO, pH al cual todas las isoformas se encontraban negativamente cargadas. Para la *Neuroepoetin*, se observó un patrón de picos bien separados, siendo su distribución cualitativa y cuantitativamente similar a la observada por IEF. De este modo, esta preparación consiste en nueve glicofomas (desde 0 a 8), con tiempos de migración cortos, mientras que la rhEPO presenta seis isoformas que migran más lentamente debido a su mayor carga negativa, otorgada por el mayor contenido de ácido siálico. En la ECZ,

el flujo electroosmótico supera la movilidad electroforética propia de las proteínas permitiendo explicar el menor tiempo de migración de las especies menos cargadas tales como las isoformas que constituyen la combinación de rhNEPO.

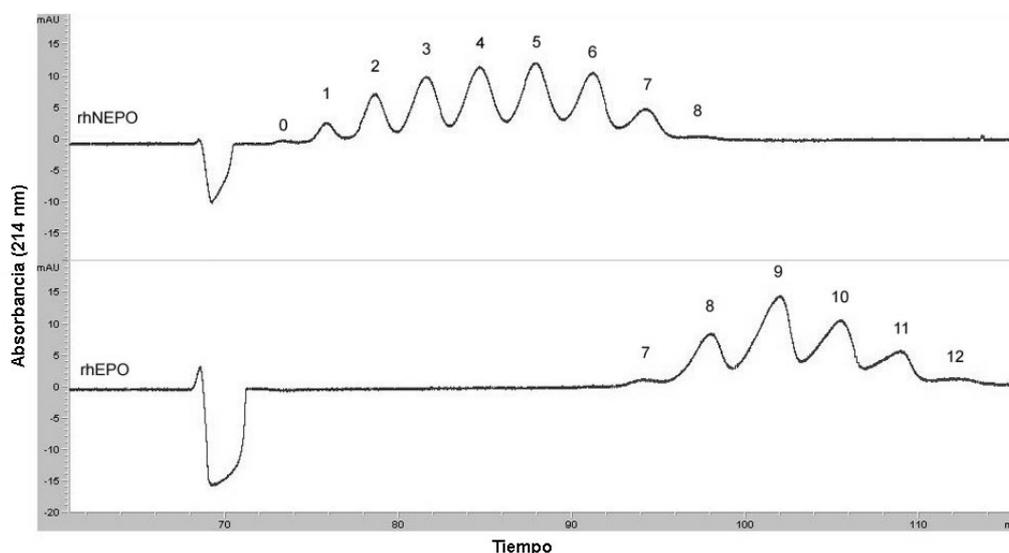


Fig. 33. Electroferogramas de ECZ obtenidos para rhEPO y rhNEPO.

Además de ser capaz de resolver especies estrechamente relacionadas, el valor práctico de la ECZ está dado por su capacidad de proporcionar información cuantitativa sobre las diferentes isoformas observadas, siendo más apropiada que la cuantificación de bandas por IEF, ya que los resultados obtenidos por IEF están muy influenciados por variaciones en los pasos de tinción, captura y digitalización de la imagen de las bandas empleando el programa adecuado.

En consecuencia, utilizando los datos obtenidos mediante ECZ se asignó a cada pico observado para la rhNEPO una isoforma (desde la 1 hasta la 7, siendo la isoforma 1 la que más rápido migró a lo largo del capilar) y se calcularon sus porcentajes mediante integración del área bajo la curva de cada pico. Para esta combinación, se observó que las isoformas 4 y 5 son las más predominantes (el porcentaje promedio de tres determinaciones fue de $21,09 \pm 1,01\%$ y $20,35 \pm 0,94\%$, respectivamente), seguidas por las isoformas 3 ($17,74 \pm 0,71\%$), 6 ($17,58 \pm 0,58\%$), 2 ($11,68 \pm 0,26\%$), 7 ($7,73 \pm 0,35\%$) y 1 ($4,10 \pm 0,04\%$), siendo este último pobremente detectado por IEF. Las isoformas 0 y 8 fueron detectadas por ECZ pero no por IEF, debido a los bajos porcentajes observados para ambas (inferiores al 0,50%).

Continuando con la misma nomenclatura de isoformas, en la rhEPO se identificaron desde la 7 hasta la 12. Por lo tanto, las isoformas 7 y 8 son compartidas

en ambas variantes, presentándose en mayores proporciones en la variante hematopoyética.

Es importante destacar que el protocolo de ECZ fue optimizado para la separación de isoformas menos ácidas (pH 7,5) como las existentes en la combinación denominada rhNEPO. Por ese motivo, para la determinación de la proporción de isoformas de la variante rhEPO, que en conjunto resultan más acídicas, se empleó el protocolo que se detalla en la Farmacopea Europea ([Council of Europe, 2005](#)), a pH 5,5. Mediante este protocolo se observó coincidencia con los valores de referencia establecidos por esta entidad reguladora para todas las isoformas presentes en la mencionada combinación eritropoyética.

28. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA IN VITRO E IN VIVO

Además de la caracterización fisicoquímica, un nuevo producto con propósitos terapéuticos requiere de procedimientos de caracterización biológica que permitan evaluar su actividad y estabilidad.

La actividad biológica es una propiedad importante que describe la capacidad o habilidad específica de un producto para llevar a cabo su efecto biológico y constituye la propiedad que se utiliza para caracterizar biológicamente las biomoléculas activas.

La evaluación de la actividad hematopoyética de la eritropoyetina es de gran relevancia ya que es la principal función biológica que ejerce en el organismo. Por lo cual, la obtención de nuevos derivados que presenten disminuida esta actividad requiere el desarrollo de diversos ensayos para valorar tal capacidad.

Hoy en día existe un gran número de bioensayos utilizados para tal fin que pueden agruparse en dos grandes grupos: aquellos que se desarrollan empleando cultivos primarios de células o líneas celulares establecidas (*in vitro*) y los que emplean animales (*in vivo*).

28.1 Evaluación de la actividad hematopoyética in vitro

Los bioensayos *in vitro* utilizados para EPO miden la capacidad de esta citoquina para inducir la estimulación de la proliferación o diferenciación celular sobre células en cultivo durante un corto tiempo. Algunos ensayos evalúan la formación de colonias eritroides en medio de cultivos semisólidos, usando la médula ósea como fuente de células con respuesta a EPO ([McLeod y col., 1974](#)). Otros ensayos miden la estimulación de la proliferación inducida por EPO [comúnmente midiendo la incorporación de timidina marcada ([Krystal, 1983](#))] o la diferenciación [midiendo la incorporación de hierro radioactivo a la hemoglobina ([de Klerk y col., 1978](#))] en cultivos

en suspensión en medio líquido. Las principales células eritroides utilizadas en estos cultivos son generalmente derivadas del bazo, médula ósea e hígado fetal de ratones.

Sin embargo, los ensayos que emplean líneas celulares eritroides han cobrado importancia sobre el empleo de cultivos primarios ya que éstas resultan más convenientes y fáciles de manipular. Algunas de las líneas celulares más comúnmente utilizadas para la medición de la actividad biológica de la rhEPO son las células T-F1 y UT-7/EPO.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo de tesis la capacidad para promover el crecimiento de líneas celulares eritroides se evaluó comparativamente tanto para la variante hematopoyética como para la nueva combinación de glicoisoformas de rhEPO empleando las líneas UT-7/EPO y TF-1. Luego de someter las células a diferentes concentraciones de estas citoquinas durante 72 hs, se reveló el ensayo y, con los resultados obtenidos, se calcularon los valores de C_{50} y sus correspondientes constantes aparentes de afinidad K_{Aaf} . En la Tabla 4 se presentan dichos valores para cada variante y en cada línea celular.

Tabla 4. Estudio de la actividad hematopoyética *in vitro*.

	Células UT-7		Células TF-1	
	C_{50} (ng.ml ⁻¹)	K_{Aaf} (M ⁻¹)	C_{50} (ng.ml ⁻¹)	K_{Aaf} (M ⁻¹)
rhEPO	0,16 ± 0,08	1,30 ± 0,63 × 10 ¹¹	0,63 ± 0,03	2,93 ± 0,15 × 10 ¹⁰
rhNEPO	0,17 ± 0,08	1,25 ± 0,60 × 10 ¹¹	0,39 ± 0,05*	4,82 ± 0,64 × 10 ¹⁰ *

* $p < 0.05$ comparado a rhEPO empleando el test *t* de Student.

Como se muestra en la Tabla 4 y en la Fig. 34, ambas variantes mostraron ser equipotentes en la línea celular UT-7, indicando una afinidad por el receptor EPOR similar en esta línea celular. En consecuencia, las constantes de afinidad de ambas moléculas fueron similares ($1,30 \pm 0,63 \times 10^{11}$ l.mol⁻¹ y $1,25 \pm 0,60 \times 10^{11}$ l.mol⁻¹), no observándose diferencias significativas entre ellas.

Contrariamente, las células TF-1 respondieron diferencialmente de acuerdo con el contenido de ácido siálico de las variantes de rhEPO en estudio (Fig. 34). De esta manera, la rhNEPO exhibió una C_{50} 1,6 veces menor que la de la rhEPO y, en consecuencia, una mayor afinidad aparente por el receptor ($p \leq 0,05$; Test *t* de Student). Este fenómeno también ha sido observado por otros autores, quienes arribaron a la conclusión de que la afinidad de los análogos de la rhEPO por el EPOR se halla inversamente relacionada con el grado de sialidación de los carbohidratos

unidos a la proteína ([Egrie y Browne, 2001](#)). Una posible explicación para este efecto podría estar dada por la influencia de los hidratos de carbono y el contenido de ácido siálico terminal, ya que [Darling y col. \(2002\)](#) demostraron que los mismos afectan la afinidad por el receptor, enmascarando o impidiendo alguna de las fuerzas electrostáticas de atracción presentes entre la EPO y su receptor y/o introduciendo algún impedimento estérico que altere la asociación.

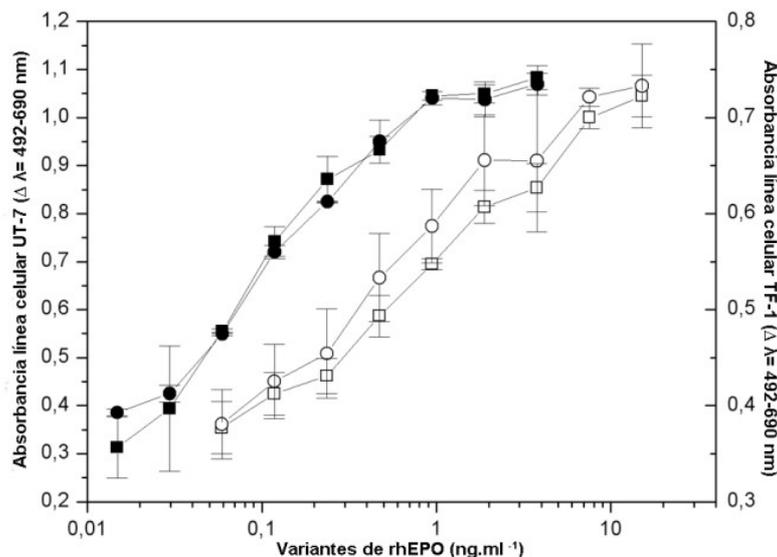


Fig. 34. Actividad biológica *in vitro* de la rhEPO (■) y rhNEPO (●) en las células UT-7 (símbolo lleno) y en las células TF-1 (símbolo vacío).

Los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD (n=3).

No obstante, aún no está clara la razón por la cual esta respuesta diferencial de las variantes más o menos sializadas no fue observada en la línea celular UT-7/EPO. Es importante destacar que el crecimiento de ambas líneas celulares originalmente no está sustentado sólo por EPO sino que también muestra dependencia de otras citoquinas, tales como GM-CSF e IL-3. Dichas moléculas actúan a través de sus receptores constituidos por una subunidad alfa específica y una subunidad beta común a ambas. Sin embargo, cuando [Komatsu y col. \(1993\)](#) establecieron la línea celular UT-7/EPO, reportaron que estas células habían perdido su respuesta a GM-CSF y a IL-3 debido a la marcada disminución de la expresión de la subunidad beta común de su receptor.

Contrariamente, la línea celular TF-1 presenta una completa dependencia de estas citoquinas, pero con EPO sólo puede mantener su crecimiento un corto tiempo ([Kitamura y col., 1989](#)).

Teniendo en cuenta la hipótesis de la existencia de un nuevo receptor para la EPO en el tejido cerebral, que no sólo comprende al EPOR sino también a la subunidad beta común antes descrita ([Brines y col., 2004](#)), la expresión diferencial de tal subunidad beta común en las líneas celulares UT-7/EPO y TF-1 podría ser la responsable del fenómeno observado. Por lo tanto, la rhNEPO, que presenta características fisicoquímicas similares a la EPO producida por células del tejido nervioso, podría exhibir incrementada actividad en las células que presenten ambas clases de receptores (tal como las TF-1) comparada con la rhEPO.

Teniendo en cuenta estos resultados, se podría pensar que la rhNEPO presentaría mayor actividad eritropoyética que la EPO. Sin embargo, ha sido ampliamente demostrado que la farmacocinética es más relevante que la afinidad por el receptor ([Egrie y Browne, 2001](#); [Wasley y col., 1991](#)) como factor condicionante de la actividad biológica *in vivo* de esta hormona.

Por consiguiente, si bien estos bioensayos son útiles para predecir la interacción entre la droga y el receptor, presentan serias desventajas ya que no son capaces de predecir el efecto de dichas variantes *in vivo*. Por tal motivo, fue necesario evaluar el efecto de las variantes de rhEPO empleando modelos que contemplen la interacción de la droga con su receptor en el organismo teniendo en cuenta su farmacocinética.

28.2 Evaluación de la actividad hematopoyética *in vivo*

Los bioensayos *in vivo* clásicos utilizados para la EPO se basan en la estimulación de la formación de glóbulos rojos mediante la administración de EPO exógena a ratas o ratones. Estos animales pueden ser previamente sometidos a condiciones de hipoxia, hemorragias o exposición a drogas citotóxicas con el fin de incrementar la población de progenitores eritroides [policitémicos ([Cotes y Bangham, 1961](#))] o no (normocitémicos). La respuesta generada en estos animales luego de inyectar la hormona es comúnmente medida mediante incorporación de hierro radioactivo en las células del bazo o glóbulos rojos o por recuento de reticulocitos mediante microscopía o citometría de flujo.

En esta oportunidad, se evaluó el efecto *in vivo* de la eficacia de las variantes de rhEPO para incrementar el hematocrito en ratones normocitémicos empleando la metodología propuesta por la Farmacopea Europea.

Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las muestras de sangre obtenidas fueron procesadas y los resultados calculados a partir de la BRP se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Estudio de la actividad hematopoyética *in vivo* (U.l.ml⁻¹).

rhEPO	rhNEPO
131.976 ± 52.324	5.034 ± 2166

Como se puede observar, la rhNEPO presentó menos del 4% de actividad hematopoyética comparada con la rhEPO; es decir, la nueva combinación fue 25 veces menos eficiente para estimular la eritropoyesis en ratones normocitémicos que la droga empleada para tal fin.

Este comportamiento era predecible si se tiene en cuenta la influencia de los carbohidratos y el ácido siálico terminal para modular la farmacocinética y la velocidad de depuración de las proteínas ([Sinclair y Elliott, 2005](#)), ya que la rhNEPO no sólo presentó menor proporción de carbohidratos más ramificados sino también menor contenido de ácido siálico terminal (ver apartado 2.2).

Esta mínima actividad hematopoyética observada para la rhNEPO constituye una de las principales ventajas sobre la EPO comercial para ser utilizada con otros propósitos terapéuticos (tales como neuroprotección), ya que la elevación de glóbulos rojos en pacientes no anémicos es considerado como un efecto adverso debido a su capacidad para provocar hipertensión y posibles eventos trombóticos ([Stohlawetz y col., 2000](#); [Wiessner y col., 2001](#)).

29. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VITRO

Con el fin de evaluar la capacidad neuroprotectora del nuevo derivado de eritropoyetina que presenta prácticamente nula actividad hematopoyética se realizaron ensayos de evaluación de la viabilidad celular empleando dos líneas celulares, una con capacidad para diferenciarse a fenotipo neuronal (PC-12) y otra con características neuronales (SH-SY5Y).

29.1 Línea celular PC-12

Esta línea celular multipotente derivada de un feocromocitoma de rata es utilizada como modelo de estudio de la apoptosis, supervivencia y diferenciación celular de las neuronas, ya que estas células son capaces de diferenciarse a fenotipo neuronal en presencia de NGF ([Greene y Tischler, 1976](#)). Este factor es esencial para la supervivencia, desarrollo y mantenimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales derivadas de las crestas neurales en el sistema nervioso periférico, así como para neuronas colinérgicas del estriado y del cerebro basal inferior ([Ebendal, 1989](#); [Hartikka](#)

[y Hefti, 1988](#)). Por lo tanto, cuando las células PC-12 son expuestas a este factor durante al menos 4 días sufren un cambio dramático en su fenotipo y adquieren numerosas propiedades de las neuronas simpáticas. A nivel morfológico se observa un cese de su división y la extensión de neuritas ([Gunning y col., 1981](#)), que está acompañado por la inducción de la excitabilidad eléctrica, sensibilidad a la acetilcolina y un incremento en la actividad específica de la enzima colinacetiltransferasa ([Das y col., 2004](#); [Dichter y col., 1977](#); [Schubert y col., 1977](#)).

Adicionalmente a esta capacidad, tales células expresan en su superficie el EPOR ([Masuda y col., 1993](#)) y en presencia de EPO sufren cambios a nivel de la expresión de diferentes proteínas asociadas a una amplia variedad de funciones, entre ellas y una de las más importantes, provoca un incremento en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas y una disminución de las pro-apoptóticas ([Renzi y col., 2002](#)).

Por tales motivos, esta línea celular fue seleccionada para analizar el potencial efecto neuroprotector de la nueva variante de rhEPO en comparación con la hormona hematopoyética, empleando ensayos de evaluación de la viabilidad celular.

29.1.1 Optimización de las condiciones del bioensayo

Con el fin de seleccionar las condiciones del bioensayo más apropiadas para llevar a cabo la evaluación de la capacidad neuroprotectora de la rhNEPO se debió seleccionar el estímulo inductor de apoptosis y el tiempo de inducción necesario para evidenciar una diferencia significativa con el control de crecimiento, que permitiese evaluar el efecto de las distintas variantes de rhEPO.

Como estímulo inductor de apoptosis se seleccionó la supresión del suero de caballo y del NGF presentes en el medio de cultivo. Estas condiciones han sido reportadas en la bibliografía como responsables de desencadenar una cascada de activación de proteínas involucradas en la apoptosis que culminan con la muerte de las células e imitan lo que ocurre en enfermedades asociadas al sistema nervioso central donde la producción de factores tróficos está comprometida, tales como Alzheimer y Parkinson ([Batistatou y Greene, 1991](#); [Haviv y col., 1997](#); [Mesner y col., 1995](#); [Vaghefi y col., 2004](#)).

En primer lugar, se evaluaron distintos tiempos de inducción de apoptosis (24, 48 y 72 h) post-diferenciación de las células en presencia de NGF durante 5 días. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 35.

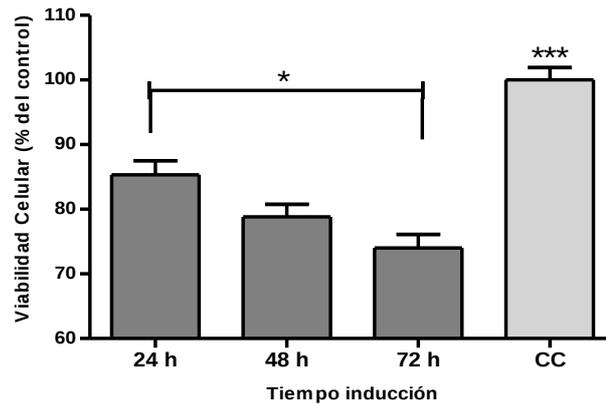


Fig. 35. Efecto de la supresión de suero y NGF a distintos tiempos, sin recambio de medio de cultivo.

CC corresponde al control de crecimiento y * $p \leq 0,1$, *** $p \leq 0,01$ representan el grado de significancia estadística luego de la aplicación del test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey ($n=3$).

Como se puede observar en la Fig. 35, todos los tiempos evaluados permitieron obtener una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de crecimiento. Claramente se puede ver que la disminución de la viabilidad fue directamente proporcional al tiempo de inducción, evidenciándose una diferencia significativa sólo entre 24 y 72 h. En este caso, la mayor diferencia observada con el control de crecimiento fue de aproximadamente 25% a las 72 h.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió seleccionar 48 h de inducción como estímulo apoptótico, ya que permitió evidenciar una respuesta intermedia con una disminución de la viabilidad de aproximadamente 20%. Asimismo, considerando que en un gran número de trabajos previos reportan mayores tiempos de diferenciación de los cultivos (7 a 14 días) ([Kim y col., 1999](#); [Kummer y col., 1997](#); [Mesner y col., 1995](#); [Renzi y col., 2002](#); [Vaghefi y col., 2004](#)), se decidió evaluar cuánto afectaba esta condición sobre la inducción de apoptosis y, para ello, se probaron dos estadios de diferenciación: 5 y 10 días. Cabe destacar que morfológicamente no se observaron grandes diferencias (datos no mostrados) tal como ya había sido reportado por [Gunning y col. \(1981\)](#), quienes observaron que las células tratadas con NGF 50 ng.ml^{-1} durante 5 o 10 días mostraban aproximadamente 40% de células con neuritas en ambos casos.

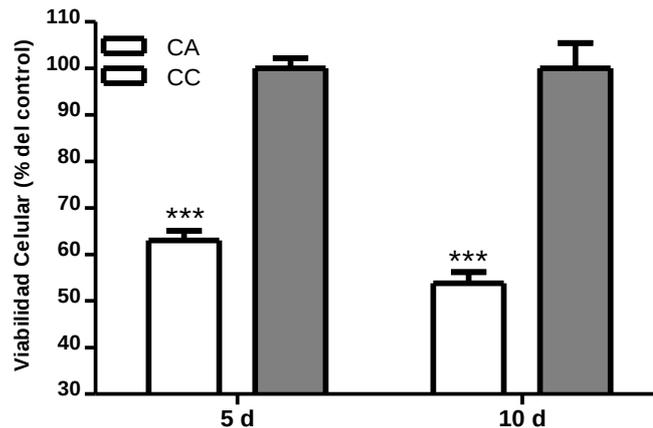


Fig. 36. Efecto de la supresión de suero y NGF a distintos tiempos, sin recambio de medio de cultivo.

CC corresponde al control de crecimiento, CA al control de apoptosis y *** p 0,01 representa el grado de significación estadística luego de aplicar el test ANOVA seguido por el test post-ANOVA de Bonferroni (n=3).

En la Fig. 36, se presenta lo ocurrido para ambos tiempos de diferenciación. En ambos casos se obtuvo una diferencia significativa superior al 35%, siendo un 10% mayor para las células que fueron diferenciadas durante 10 días. Este comportamiento también ha sido observado por otros autores ([Vaghefi y col., 2004](#)). Sin embargo, la disminución de la viabilidad en dicho trabajo fue mucho más dramática, presentando menos del 10% de viabilidad luego de 48 horas de inducción de apoptosis. Estas diferencias pueden deberse al estado bioquímico de la célula, que puede diferir en el número de pasajes y, por lo tanto, en la expresión de algunas proteínas intracelulares, con respecto a la línea celular del mencionado grupo de investigación.

Tomando en consideración estos resultados, se decidió evaluar la acción de la rhNEPO y la rhEPO diferenciando las células durante 10 días en presencia de NGF y realizando la inducción de apoptosis durante 48 horas.

29.1.2 Efecto de las variantes de rhEPO

Una vez seleccionadas las condiciones de inducción de apoptosis, se hizo necesario definir qué tratamiento se llevaría a cabo con las variantes de rhEPO en estudio. Para ello, se tuvo en cuenta el trabajo de [Renzi y col. \(2002\)](#), en el que observaron que a bajas concentraciones de rhEPO (10 pM~ 0,31 ng.ml⁻¹) se requirieron 24 horas de incubación con esta hormona para evidenciar cambios en la expresión de los genes involucrados en la apoptosis, tales como anti-apoptóticos (Bcl-X_L) y pro-apoptóticos (Bax). Asimismo, se consideraron otros trabajos previos ([Li y](#)

col., 2008; Morishita y col., 1997) que reportaron que la inhibición de la apoptosis por parte de EPO requirió de pre-tratamiento. Con toda esta información se decidió incubar las células en presencia de dos concentraciones de cada combinación de glicoisformas de rhEPO durante 24 horas antes de desencadenar la muerte celular programada.

Las concentraciones evaluadas fueron seleccionadas en base a lo reportado en la bibliografía para otros inductores de apoptosis. Por ejemplo Li y col. (2008) evaluaron un rango de 0,5 a 10 UI.ml⁻¹ de rhEPO y evidenciaron un efecto protector por parte de la rhEPO a partir de 1 UI.ml⁻¹; por otro lado, Um y col. (2007) evidenciaron diferencias significativas empleando 0,75 y 7,5 ng.ml⁻¹ (~1 UI.ml⁻¹), dentro de este mismo rango, Morishita y col. (1997) observaron un efecto citoprotector de rhEPO de 0,1 a 10 ng.ml⁻¹. Teniendo en cuenta esta bibliografía, las células una vez diferenciadas fueron incubadas durante 24 h en presencia de 7,5 y 37,5 ng.ml⁻¹ (1 y 5 UI.ml⁻¹, respectivamente) de cada variante en estudio y, luego de someterlas durante 48 horas al estímulo apoptótico en presencia de rhEPO o rhNEPO, el ensayo fue revelado poniendo en evidencia la actividad deshidrogenasa presente en el medio (mediante el empleo combinado de los reactivos MTS/PMS). Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 37.

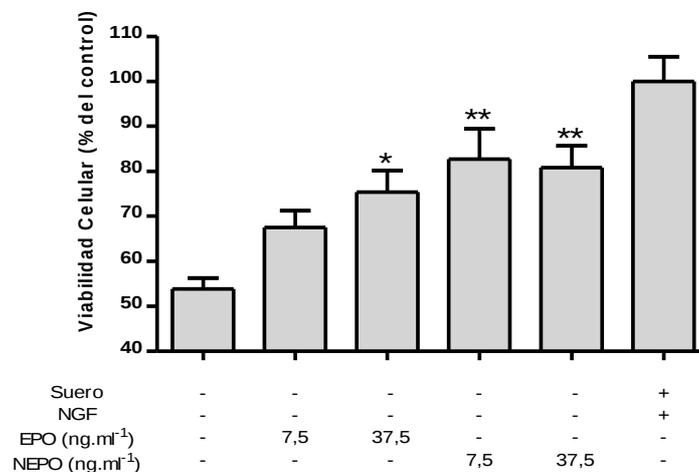


Fig. 37. Efecto protector de la rhNEPO sobre las células PC-12 diferenciadas luego de la inducción de apoptosis por supresión de suero y NGF.

Las variantes rhEPO y rhNEPO fueron agregadas al cultivo 24 h antes de la inducción de apoptosis y luego en forma concomitante al estímulo apoptótico. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de supervivencia MTS/PMS. Grado de significancia estadística: * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 comparados con el grupo sometido a apoptosis sin ningún tratamiento. Test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey (n=6).

Como se muestra en la Fig. 37, la supresión de suero y NGF redujo significativamente la viabilidad celular a $58,4 \pm 6,4\%$ comparado con el control ($p \leq 0,01$). La rhEPO fue sólo capaz de prevenir la apoptosis a una alta concentración ($37,5 \text{ ng.ml}^{-1}$; $p \leq 0,05$). Sin embargo, la rhNEPO protegió las células PC-12 diferenciadas de la muerte celular a ambas concentraciones, incrementando la supervivencia a $89,9 \pm 19\%$ y $88,5 \pm 12,9 \%$, respectivamente ($p \leq 0,01$), sin diferencias significativas entre ellas.

Este efecto diferencial observado entre la rhEPO y la rhNEPO podría explicarse a través de la capacidad de unión al receptor de cada molécula. Teniendo en cuenta la hipótesis de la existencia de un receptor heteromérico en esta línea celular reportada por [Leist y col. \(2004\)](#) y considerando que la activación del mismo requiere altas concentraciones de EPO debido a que la afinidad por dicha molécula es menor que la afinidad del receptor homodimérico ([Konstantinopoulos y col., 2007](#)) podría pensarse que la rhNEPO, al tener una composición de carbohidratos y ácido siálico diferente, presenta mayor afinidad por dicho receptor. De esta manera, serían necesarias menores concentraciones para ejercer su efecto citoprotector.

Sin embargo, aún no está completamente claro si éste es el principal receptor ya que en oposición a estos hallazgos [Um y col. \(2007\)](#) demostraron que en la línea celular PC-12 no se expresa la cadena βcR y, por lo tanto, el efecto de la EPO estaría mediado sólo por el receptor homodimérico (EPOR₂). En esta situación, la menor concentración de rhNEPO necesaria para ejercer el efecto citoprotector podría explicarse teniendo en cuenta lo que reportan otros autores en relación a la afinidad de análogos de la rhEPO por el EPOR. Dichos autores establecen que la misma está inversamente relacionada al grado de sialidación de los carbohidratos unidos a la proteína en células hematopoyéticas ([Egrie y Browne, 2001](#)), tal como se explicó para la línea celular TF-1 (apartado 3.1).

Tratando de dilucidar esto, [Sanchez y col. \(2009\)](#) evaluaron mediante RT-PCR e IHQ la existencia de EPOR y el βcR en distintas áreas del cerebro de rata, hallando muy bajos niveles de βcR que no se correlacionaron con la existencia de EPO, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos por [Um y col. \(2007\)](#). Estos resultados los llevaron a postular que la mayoría de las neuronas expresan altos niveles de EPOR pero bajos o prácticamente nulos niveles de βcR .

Independientemente del receptor que podría estar involucrado en este mecanismo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la rhNEPO exhibe, en estas células, un efecto citoprotector *in vitro* a menor concentración que la rhEPO. Esta característica la postula como una molécula muy promisoriosa para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

29.2 Línea celular SH-SY5Y

Otra de las líneas celulares empleadas para evaluar el efecto citoprotector de la nueva variante de rhEPO fue la línea SH-SY5Y. La misma ha sido ampliamente utilizada como modelo neuronal desde comienzos de 1980, ya que estas células poseen propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas. Por ejemplo, expresan marcadores neuronales con actividad enzimática (tirosina y dopamina- β -hidroxilasas), proteínas neurofilamentosas, así como también receptores muscarínicos, opioides y para NGF. Además, metabolizan la norepinefrina, propiedad típica de las células noradrenérgicas ([Ciccarone y col., 1989](#)). Sumado a estas características, poseen la capacidad de proliferar en cultivo durante largo tiempo sin contaminación, un prerequisite muy importante para el desarrollo de un modelo celular *in vitro*.

Además, presentan propiedades de células multipotentes, por lo que pueden diferenciarse aún más hacia diferentes fenotipos neuronales con características distintas en presencia de una variedad de estímulos, que incluyen ácido retinoico ([Singh y Kaur, 2007](#)), acetato de tetradecanoilforbol [TPA, ([Pahlman y col., 1981](#))], factor neurotrófico derivado del cerebro [BDNF, ([Cernaianu y col., 2008](#))] y STP ([Mollereau y col., 2007](#); [Pregi y col., 2006](#)), entre otros.

Como consecuencia de todas las propiedades antes mencionadas, esta línea celular en su forma diferenciada o no, ha sido ampliamente utilizada en estudios neurológicos experimentales, que incluyen análisis de la diferenciación neuronal, del metabolismo y de funciones relacionadas a procesos neurodegenerativos y neuroadaptativos, así como también de neurotoxicidad y de neuroprotección ([Xie y col., 2010](#)).

Adicionalmente a estas características y, a diferencia de la línea que le dio origen, las SH-SY5Y expresan receptores para EPO ([Sartelet y col., 2007](#)). Por tal motivo, fue seleccionada para evaluar el potencial efecto neuroprotector de la nueva variante (rhNEPO) en comparación con la hormona hematopoyética empleando ensayos de viabilidad celular.

29.2.1 Optimización de las condiciones del bioensayo

De igual manera que para el bioensayo desarrollado empleando la línea celular PC-12, inicialmente se seleccionaron las condiciones del bioensayo más apropiadas que permitiesen evaluar la capacidad neuroprotectora de la rhNEPO.

La primera condición importante que se debió definir fue qué inductor de apoptosis se utilizaría en el ensayo. Tomando en consideración que estas células no sólo pueden emplearse en estado proliferativo sino también pueden ser diferenciadas hacia neuronas maduras, se decidió evaluar el efecto de la rhNEPO y la rhEPO en ambos estadios celulares y para ello, se seleccionaron dos inductores de apoptosis diferentes.

En primer lugar, para trabajar con las células indiferenciadas, basándose en la bibliografía y teniendo en cuenta que esta línea celular es ampliamente utilizada como modelo de la enfermedad de Parkinson *in vitro* (Xie y col., 2010) debido a sus características dopaminérgicas, se seleccionó como inductor de apoptosis la 6-OHDA. Esta neurotoxina causa la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas, actuando como un agente productor de ROS, tales como peróxido de hidrógeno, radicales superóxidos e hidroxilos involucrados en procesos de la patogénesis de dicha dolencia (Gee y Davison, 1989; Kumar y col., 1995; Soto-Otero y col., 2000). No sólo esta toxina es empleada en modelos *in vitro* sino que, además, es comúnmente utilizada en modelos animales de dicha enfermedad (Schober, 2004).

Una vez establecido cuál sería el inductor para esta condición, se determinó qué concentración del mismo y qué tiempo de incubación en presencia de dicha droga permitía evidenciar una diferencia significativa con el control de apoptosis y, al mismo tiempo, que este efecto pudiese ser revertido por las variantes de rhEPO. Para tal fin, las células que fueron previamente sembradas a una densidad de $9,0 \cdot 10^4 \text{cél.cm}^{-2}$ en placas de 96 pozos, se incubaron con distintas concentraciones de 6-OHDA durante 24 h. En la Fig. 38 se puede observar la curva dosis-respuesta.

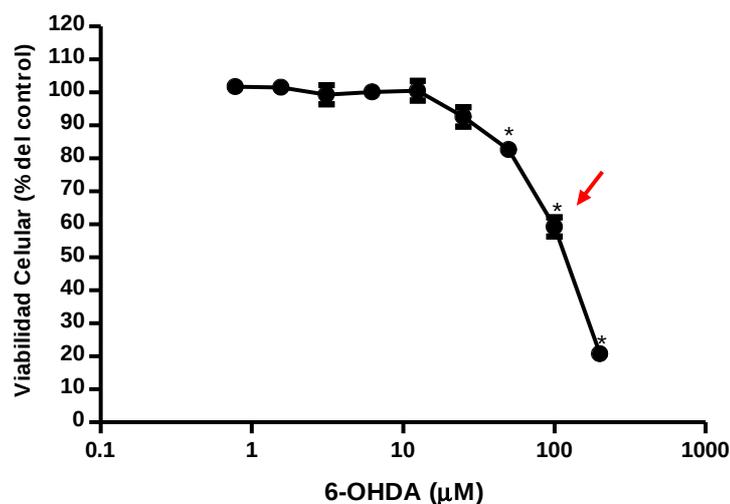


Fig. 38. Efecto de diferentes dosis de 6-OHDA sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y.

Las células fueron incubadas con diluciones seriadas al medio de la neurotoxina 6-OHDA desde 200 μ M durante 24 h. Los valores se expresan como el porcentaje respecto al control sin tratar. Grado de significancia estadística: * $p \leq 0,001$ comparado con el control mediante test ANOVA seguido por el test de Tukey ($n=3$).

La citotoxicidad de esta droga fue estadísticamente significativa a partir de los 50 μ M de 6-OHDA luego de incubar las células durante 24 h en presencia de dicha neurotoxina. Estos resultados son concordantes con los reportados por otros autores, quienes observaron tal efecto a concentraciones superiores a 50 μ M ([Guo y col., 2007](#); [Hara y col., 2007](#); [Shi y col., 2011](#); [Song y col., 2010](#)).

Como se esperaba trabajar con una concentración que permitiese aproximadamente una disminución del 50% de la viabilidad, se seleccionó una concentración de 100 μ M de 6-OHDA para evaluar el efecto de la rhNEPO y de la hormona hematopoyética, incubando las células durante 24 h.

Anteriormente se mencionó que estas células indiferenciadas son ampliamente utilizadas como modelo *in vitro* para el estudio de la enfermedad de Parkinson; sin embargo presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, como las células se encuentran en constante división celular, el número de células se incrementa durante el curso del experimento, lo cual es una dificultad para distinguir si un agente neuroprotector o neurotóxico afecta la velocidad de proliferación o la velocidad de muerte ([Xie y col., 2010](#)). En segundo lugar, las células en cultivo no están sincronizadas y no siempre pueden llegar a exhibir todos los marcadores típicos de las neuronas maduras, lo cual genera incertidumbre en los experimentos. Otra limitación, está dada por los bajos niveles de expresión de las enzimas que sintetizan dopamina, así como también de los transportadores para dicho neurotransmisor ([Presgraves y col., 2004](#)). Por estos motivos, la línea celular SH-SY5Y en estado proliferativo (indiferenciadas) no sería un modelo ideal para llevar a cabo este estudio ([Xie y col., 2010](#)).

Teniendo en cuenta esto, se decidió evaluar el efecto de las variantes de rhEPO en células SH-SY5Y diferenciadas debido a que, en dichas condiciones, se observa un detenimiento de la proliferación, alcanzando una población estable con la aparición de neuritas acompañada por cambios a nivel bioquímico, ultraestructural y electrofisiológico que llevan a las células a presentar una gran similitud con las neuronas presentes en el cerebro humano.

La STP es uno de los agentes utilizados para inducir la maduración neuronal de estas células ya que tiene la capacidad de inducir cambios funcionales y morfológicos en ellas dando lugar a un fenotipo neuronal maduro ([Jalava y col., 1992](#); [Mollereau y col., 2007](#); [Pregi y col., 2006](#)). Sin embargo, este alcaloide ha sido ampliamente

caracterizado por ser un excelente inductor de apoptosis en esta línea celular ([Lopez y Ferrer, 2000](#); [Pregi y col., 2006](#); [Prince y Orelan, 1997](#)). Esto puede ser explicado por el hecho de que es un inhibidor no selectivo de múltiples proteínas kinasas, entre ellas la proteína kinasa C, la cual juega un rol importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular ([Papp y col., 2004](#); [Spitaler y Cantrell, 2004](#)).

Considerando esto, se seleccionó este inductor no sólo para la diferenciación celular sino también para inducir apoptosis en forma simultánea. Para poder seleccionar la concentración que permitiera evaluar el efecto neuroprotector de la nueva combinación de rhEPO, las células fueron expuestas a distintas concentraciones del alcaloide durante 24 h. Transcurrido este tiempo el ensayo se reveló y se obtuvieron los resultados presentados a continuación (Fig. 39).

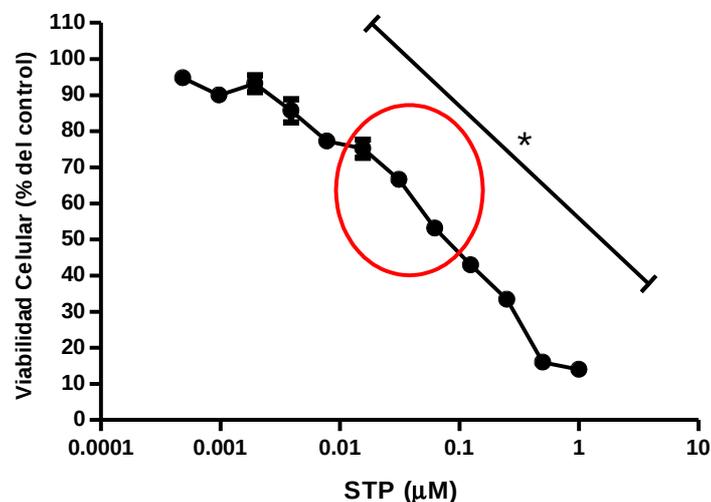


Fig. 39. Efecto de diferentes concentraciones de STP sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y.

Las células fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de STP partiendo de 1 μM durante 24 h. La elipse roja marca las concentraciones que permitieron una reducción de la viabilidad del 30% al 50%. La barra negra con el * indica que todas las concentraciones a partir de 4 nM presentaron una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control sin tratar ($p \leq 0,05$) empleando el test ANOVA seguido del Test de Tukey ($n=3$).

Como se puede observar en la Fig. 39, bajas concentraciones de STP (4 nM) fueron suficientes para ocasionar una disminución significativa de la viabilidad celular respecto al control sin tratar. Sin embargo, como se destaca con la elipse roja, las concentraciones más apropiadas para evaluar las combinaciones de rhEPO fueron aquellas que permitieron una reducción de la viabilidad entre el 30 y el 50%, las cuales estuvieron comprendidas entre 10 y 100 nM de STP. De este rango se decidió evaluar 25 nM ya que [Pregi y col. \(2006\)](#) habían reportado que incubando las células a esta

concentración, durante por lo menos 12 horas, la misma resultaba suficiente para desencadenar la diferenciación y al mismo tiempo inducir apoptosis. Por tal motivo, se seleccionó dicha concentración para evaluar el efecto de las dos combinaciones de rhEPO.

29.2.2 Efecto de las variantes de rhEPO

Una vez establecidas las condiciones de apoptosis que más se adecuaron para cada condición celular evaluada (estado proliferativo o diferenciado) se debió establecer qué tratamientos en cada caso se emplearían para evaluar el efecto de la nueva variante de rhEPO obtenida.

Si bien en la bibliografía se reporta el efecto de la rhEPO sobre estas células luego de someterlas a diversos estímulos apoptóticos, no se hallaron reportes del efecto de la hormona sobre la apoptosis inducida por la 6-OHDA en esta línea celular indiferenciada. Por tal motivo, se analizó en primer lugar el efecto de distintas concentraciones de rhEPO, con el fin de seleccionar aquellas que evidenciaran una protección estadísticamente significativa para luego continuar con la evaluación de la nueva combinación de glicoisofomas. El tratamiento elegido, tal como para las células PC-12, fue la incubación durante 24 h previas a la inducción de apoptosis por parte de la 6-OHDA y luego de modo concomitante con dicho inductor, dado que otros trabajos anteriormente publicados con diferentes inductores de apoptosis reportaron que para que la rhEPO ejerza citoprotección se requiere de pretratamiento ([Pregi y col., 2006](#); [Pregi y col., 2009](#); [Sun y col., 2008](#)). Asimismo, [Pregi y col. \(2006\)](#) demostraron que la exposición de las células SH-SY5Y a esta hormona incrementa la expresión de EPOR tanto a nivel del mRNA como de la proteína en una manera dosis dependiente, lo que sugiere que la exposición previa permitiría potenciar el efecto de la rhEPO debido a un incremento en el número de receptores específicos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, las células fueron preincubadas durante 24 h en presencia de diluciones seriadas de la hormona desde 760 ng.ml⁻¹ (100 UI.ml⁻¹) hasta 5,9 ng.ml⁻¹ (0,78 UI.ml⁻¹) y posteriormente fueron tratadas con 100 μM de 6-OHDA durante 24 h en presencia de dicha hormona. En la Fig. 40 se presentan los resultados obtenidos para esta experiencia.

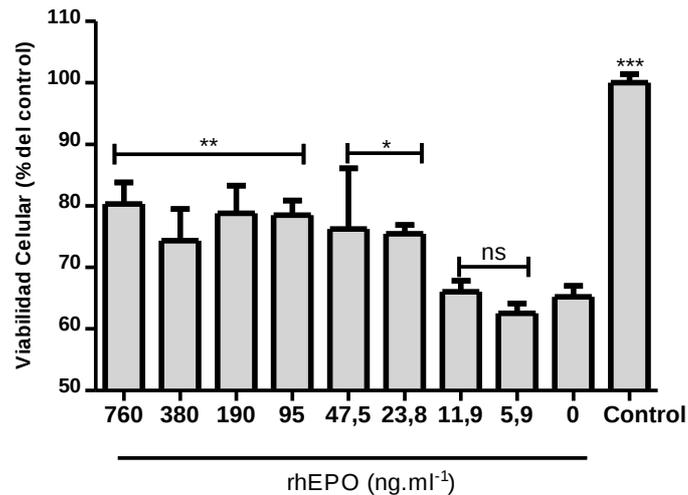


Fig. 40. Efecto de diferentes concentraciones de rhEPO sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y luego de la inducción de apoptosis con 100 μ M de 6-OHDA.

Las células fueron preincubadas durante 24 h con diluciones seriadas al medio de rhEPO desde 760 ng.ml⁻¹ y posteriormente tratadas con 100 μ M de 6-OHDA durante 24 h en presencia de dicha hormona. n=3. Grado de significancia estadística: * $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ y ns: sin diferencia significativa, comparado con el control empleando el test ANOVA seguido por el test de Tukey (n=3).

Como se puede observar, el tratamiento con 6-OHDA redujo significativamente la viabilidad celular al $65,2 \pm 1,7\%$. Esta disminución ya había sido reportada por otros autores ([Guo y col., 2007](#); [Song y col., 2010](#)). Por lo tanto, se puede concluir que 100 μ M es una cantidad adecuada para inducir apoptosis y al mismo tiempo puede ser revertida eficientemente con el tratamiento de rhEPO con dosis que varían desde 760 hasta 23,8 ng.ml⁻¹. La recuperación observada al exponer las células antes y durante la inducción de apoptosis a diferentes concentraciones de rhEPO fue de aproximadamente 20% con respecto a las células que sólo fueron tratadas con 6-OHDA. Por lo tanto, teniendo en cuenta que [Pregi y col. \(2006\)](#) evidenciaron un efecto protector por parte de la rhEPO sobre la apoptosis inducida por otro agente cuando emplearon 25 UI.ml⁻¹ (190 ng.ml⁻¹), se decidió evaluar el efecto de la nueva variante de rhEPO empleando esa concentración y una menor (76 ng.ml⁻¹).

A continuación se presentan los resultados obtenidos luego de tratar durante 24 h las células con la rhNEPO o la hormona hematopoyética a dichas concentraciones y luego someterlas durante 24 h a la acción combinada de 6-OHDA y de las mencionadas variantes (Fig. 41).

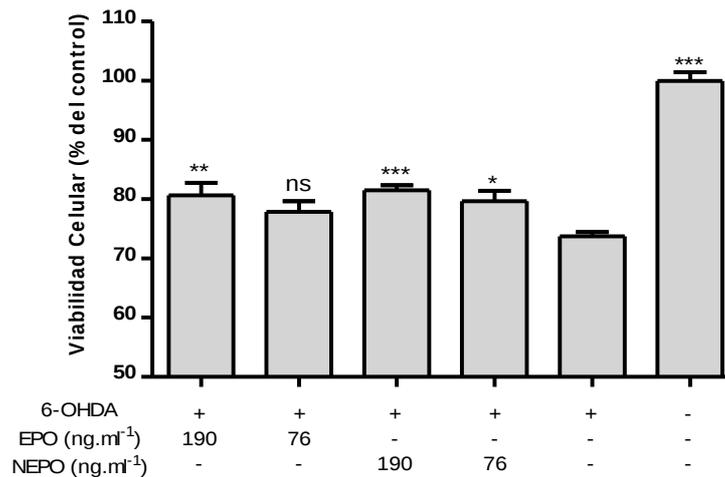


Fig. 41. Efecto protector de la rhNEPO sobre las células SH-SY5Y indiferenciadas luego de la inducción de apoptosis por 100 μ M de 6-OHDA.

rhEPO y rhNEPO fueron agregadas al cultivo 24 h antes de la inducción de apoptosis. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de supervivencia de la fosfatasa ácida. Grado de significancia estadística: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$ comparados con el grupo sometido a apoptosis sin ningún tratamiento. Test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey ($n=3$).

Como se puede observar el inductor de apoptosis redujo aproximadamente un 25% la viabilidad celular con respecto al control de crecimiento. Los tratamientos previos con las concentraciones más elevadas de ambas variantes protegieron las células de la apoptosis, aumentando su viabilidad en un 10% con respecto a las células que sólo fueron tratadas con el inductor, mientras que a la menor concentración, sólo la rhNEPO fue capaz de evidenciar un efecto citoprotector. Por lo tanto, así como se visualizó con las células PC-12, se requirieron menores concentraciones de rhNEPO para ejercer un efecto protector sobre las células SH-SY5Y sometidas a apoptosis mediante 6-OHDA. La posible explicación de esto se detalló anteriormente para el caso de las células PC-12.

En cuanto al efecto citoprotector por parte de la rhEPO en células sometidas a diferenciación y apoptosis mediante incubación con el inductor STP, [Pregi y col. \(2006\)](#) demostraron un efecto protector por parte de la rhEPO empleando 25 UI.ml⁻¹ (190 ng.ml⁻¹) en presencia de este inductor de apoptosis tras una preincubación durante 12 horas con la hormona y luego 12 horas más en presencia de STP 25 nM. Sin embargo, no hay reportes de un pretratamiento durante 24 h y, luego de la inducción de apoptosis durante 24 h adicionales en presencia de dicha hormona para este inductor. Por lo tanto, partiendo de la base del trabajo de [Pregi y col. \(2006\)](#), se decidió evaluar qué ocurría cuando las células se pretrataban durante 24 h con dicha

concentración de rhEPO y se las sometía posteriormente durante 24 h al inductor de apoptosis en presencia de la citoquina.

Para tal fin, se decidió evaluar no sólo 190 ng.ml⁻¹ (25 UI.ml⁻¹), sino también dos concentraciones inferiores 95 y 47,5 UI.ml⁻¹ (95 y 47,5 ng.ml⁻¹, respectivamente). Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 42.

De la visualización de la gráfica se concluye que las células que no recibieron tratamiento con rhEPO pero sí con STP redujeron su viabilidad aproximadamente 40% con respecto al control, mientras que el pretratamiento con las diferentes concentraciones de rhEPO preservó significativamente la viabilidad celular con respecto a las células que no lo recibieron. Asimismo, la menor concentración de rhEPO evaluada presentó una diferencia significativa inferior ($p \leq 0,1$) respecto de las concentraciones mayores.

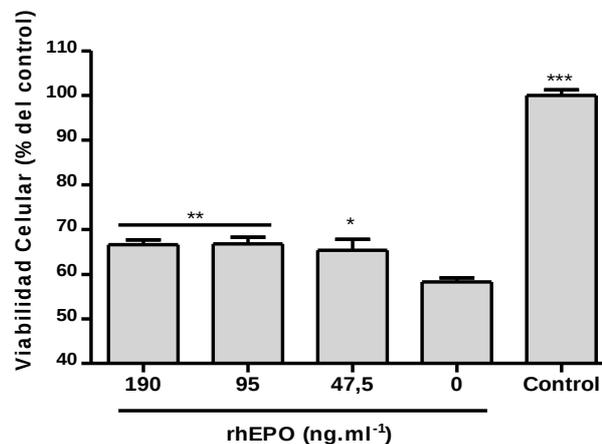


Fig. 42. Efecto de diferentes concentraciones de rhEPO sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y sometidas a diferenciación y apoptosis con 25 nM de STP.

Las células fueron preincubadas durante 24 h con 3 diluciones seriadas al medio de rhEPO desde 190 ng.ml⁻¹ y posteriormente se trataron con 25 nM de STP durante 24 h en presencia de dicha hormona. Los valores se expresan como el porcentaje con respecto al control sin tratar. Grado de significación estadística: * $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, comparado con el control empleando el test ANOVA seguido por el test de Tukey ($n=3$).

En base a estos resultados, que concuerdan con los obtenidos por [Pregi y col. \(2006\)](#), se decidió reiterar estas condiciones tanto para la rhEPO como para la rhNEPO y, al mismo tiempo, evaluar una concentración 5 veces menor (37,5 ng.ml⁻¹) a los fines de ver si se observaba el mismo efecto evidenciado con estas células luego de la inducción de apoptosis con 6-OHDA.

Para tal fin, y siguiendo el concepto de preincubación durante 24 h, las células fueron incubadas durante este tiempo en presencia de 190 y 37,5 ng.ml⁻¹ (25 y 5 U.m⁻¹, respectivamente). Los resultados obtenidos para este experimento se presentan a continuación (Fig. 43).

En la Fig. 43 se visualiza que en ausencia de las variantes de rhEPO las células SH-SY5Y mostraron aproximadamente 89,5 ± 2,4% de viabilidad comparado con el control de crecimiento, mientras que los pretratamientos tanto con la variante no hematopoyética como la hematopoyética a todas las concentraciones evaluadas fue eficaz para incrementar la supervivencia celular a un rango entre 94 y 96 % comparado con el control. A diferencia de los anteriores ensayos (PC-12 y SH-SY5Y indiferenciadas), no se observaron diferencias significativas entre el efecto de las moléculas a ambas concentraciones evaluadas, indicando una acción citoprotectora similar.

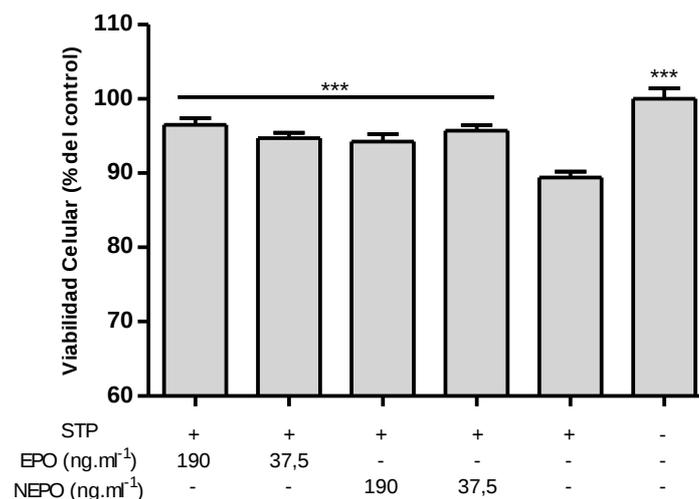


Fig. 43. Efecto protector de las variantes de rhEPO sobre las células SH-SY5Y sometidas a diferenciación e inducción de apoptosis con 25 nM de STP.

Las variantes rhEPO y rhNEPO fueron agregadas al cultivo 24 h antes de la inducción de apoptosis. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de supervivencia de MTS/PMS. Grado de significancia estadística: *** $p \leq 0,001$ comparados con el grupo sometido a apoptosis sin ningún tratamiento (n=6). Test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey.

Finalmente, es importante destacar que así como para el caso de las células PC-12, la viabilidad celular no fue alterada por la adición de la rhEPO o rhNEPO al cultivo control en ninguno de los estados evaluados.

30. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA DE LA NUEVA VARIANTE DE rhEPO EN CULTIVO DE CÉLULAS

Uno de los principales mecanismos involucrados en la neuroprotección es la capacidad de un determinado agente neuroprotector para prevenir la muerte celular programada desencadenada por algún estímulo apoptótico que ponga en riesgo la integridad de la estructura e interrelaciones de las neuronas. Hasta el momento se ha reportado la capacidad de la rhEPO de evitar la apoptosis en un gran número de líneas celulares y cultivos primarios de células neuronales. Por tal motivo, una vez demostrado que la rhNEPO presentaba un efecto neuroprotector similar a la rhEPO en las líneas celulares PC-12 y SH-SY5Y se decidió evaluar si dicho efecto también estaba mediado por la capacidad antiapoptótica observada para la rhEPO ([Ghezzi y Brines, 2004](#); [Sargin y col., 2010](#); [Sosa y col., 2008](#)).

Para tal fin, no sólo se trabajó con la línea celular PC-12 diferenciada durante 7 días con NGF y con la línea celular SH-SY5Y indiferenciada sino también con cultivos primarios de neuronas corticales de rata. Para seleccionar la metodología que se emplearía para evaluar la apoptosis en dichos cultivos se tuvo en cuenta que la apoptosis es un proceso dinámico que se destaca por presentar diferentes signos dependiendo del momento en el cual se encuentre la célula. Por esta razón, es importante considerar algunos aspectos de la apoptosis tales como el momento en el que aparece un evento determinado y la duración de los procesos relacionados. Otro factor importante es que a pesar de que se induzca apoptosis en células que se encuentran en la misma fase del ciclo celular, el proceso de muerte no es sincrónico y, por lo tanto, el empleo de un determinado marcador es representativo de un momento específico.

Debido a que la definición de apoptosis fue establecida sobre la base de parámetros morfológicos, éstos son, generalmente, los primeros que deben ser evaluados en un estudio. En este aspecto, hay que tener en cuenta que uno de los eventos más tempranos de la apoptosis es la deshidratación celular que conlleva a la condensación del citoplasma y cambios en la forma y el tamaño celular. En primer lugar, la célula sufre un cambio en el índice de refracción seguido por la contracción del citoplasma y la condensación nuclear ([Hengartner, 1997](#)). La forma original de la célula se altera reduciendo su tamaño y adquiriendo una forma ameboidal. La condensación de la cromatina nuclear es uno de los cambios más característicos y comienza en la periferia del núcleo, adquiriendo una forma cóncava que se asemeja a una medialuna. En este estado el ADN presenta hipercondensación y se marca intensamente con los fluorocromos capaces de intercalarse en dicho ADN. Asimismo,

la envoltura nuclear se desintegra, la laminina sufre degradación proteolítica y, por último, se produce la fragmentación nuclear.

30.1 Rol antiapoptótico de la nueva variante en cultivo de células SH-SY5Y

Para poner en evidencia los cambios morfológicos, fundamentalmente a nivel nuclear, que sufren estas células sometidas a la neurotoxina 6-OHDA, se decidió estudiar los cambios a nivel de la condensación de la cromatina mediante tinción del ADN con el fluorocromo Hoechst 33258, que permite visualizar la morfología de la misma.

Antes de analizar el efecto de la rhNEPO fue necesario determinar qué concentraciones del inductor (6-OHDA) y qué tiempo de inducción permitían obtener una diferencia significativa entre el control de crecimiento y el control de muerte celular, ya que según el marcador que se desea evaluar es adecuado optimizar las condiciones del ensayo que permitan estudiarlo.

Para tal fin, las células se sembraron a una densidad de $2,0 \cdot 10^5$ cél.cm⁻², se cultivaron durante 72 h y se indujo apoptosis mediante el agregado de diferentes concentraciones de 6-OHDA (75, 100, 200 μ M) durante 24 h, teniendo en cuenta el tiempo seleccionado en el ensayo de proliferación. Sin embargo, este tiempo no permitió realizar el estudio ya que las células no permanecieron adheridas a la superficie luego del tiempo de inducción y los sucesivos pasos para efectuar la marcación de las células. Por tal motivo, se decidió evaluar un menor tiempo de inducción basándose en la bibliografía, en la que se reporta que la duración de la apoptosis puede variar pero generalmente es corta (3-6 horas), incluso es más breve que la duración de la mitosis ([Kerr y col., 1972](#); [Wyllie y col., 1992](#)). De este modo, se evaluó la misma concentración empleada en el ensayo de viabilidad celular pero incubando las células sólo durante 4 h en presencia de dicha concentración de la neurotoxina. Los resultados obtenidos se presentan a continuación (Fig.44).

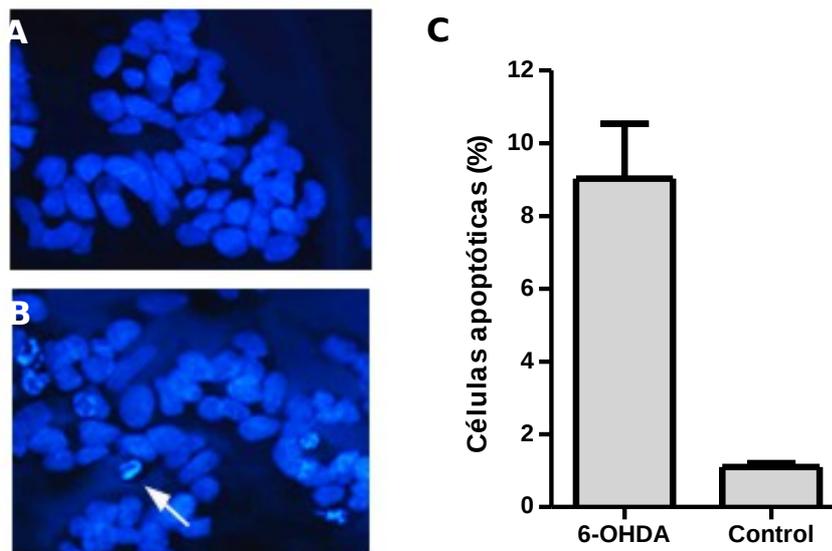


Fig. 44. Efecto de 100 μ M de 6-OHDA durante 4 h de inducción.

- A. Células SH-SY5Y control.
 B. Células SH-SY5Y tratadas con 100 μ M de 6-OHDA durante 4 h.
 C. Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas en cada tratamiento (%). La flecha blanca señala una célula con características apoptóticas. El número de células apoptóticas se determinó mediante recuento de \sim 500 células totales luego de la tinción con Hoechst 33258. Grado de significancia estadística: *** $p \leq 0,001$ comparados con el control. Test t de *Student* (n=3).

En la Fig. 44A, que corresponde al control, prácticamente todas las células presentaron una morfología compatible con células viables (núcleo teñido de azul con forma ovoide y color tenue debido a que el ADN se encontraba relajado), mientras que en la Fig. 44B se observa que luego de incubar las células durante 4 h en presencia de la neurotoxina un porcentaje de células exhibieron características apoptóticas tales como ADN condensando y menor tamaño. Al realizar el recuento de estas células con características apoptóticas, se pudo observar que el tratamiento durante este tiempo permitió obtener un $9,0 \pm 4,3\%$ de células apoptóticas (Fig. 44C) que es estadísticamente diferente al observado en el control, el cual no superó el 1%.

De este modo, se seleccionó esta condición para evaluar el efecto de la nueva variante de rhEPO en comparación con la droga hematopoyética. Sobre la base de los resultados obtenidos en los ensayos de neuroprotección se decidió reiterar el mismo tratamiento, es decir, las células fueron pretratadas durante 24 h con distintas concentraciones de la nueva molécula y de la rhEPO (173, 345 y 690 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ que corresponden a 25, 50 y 100 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente). Si se compara la masa empleada en el ensayo de proliferación para 25 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ se puede notar que en este caso es ligeramente inferior. Esto se debe a que en este punto se cambió por un lote

de rhEPO que difirió en la actividad específica y para mantener las unidades de actividad biológicas anteriormente utilizadas se debió alterar la masa de cada variante en estudio.

Transcurridas 24 h, las células fueron expuestas a 100 μM de 6-OHDA durante 4 h en presencia de las moléculas y, luego, fueron fijadas y coloreadas con el colorante Hoechst. Estudios previos de [Díaz Martín \(2006\)](#) han demostrado que la exposición corta de las células a bajas concentraciones de dicho colorante resulta en una fuerte marcación de las células apoptóticas.

El tratamiento con la concentración más baja de rhEPO (175 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ o 25 $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$) no evidenció un efecto antiapoptótico estadísticamente significativo (Fig. 45), aunque se observó una disminución con respecto al control de apoptosis de aproximadamente 25%. En contraposición, la rhNEPO a dicha concentración sí fue capaz de reducir la apoptosis en aproximadamente 40%, mientras que ambas moléculas fueron capaces de proteger la apoptosis de forma significativa a las mayores concentraciones evaluadas, no observándose diferencias entre ellas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, se puede ver que en ambos casos se requirió menor concentración de la nueva variante para evidenciar un efecto protector.

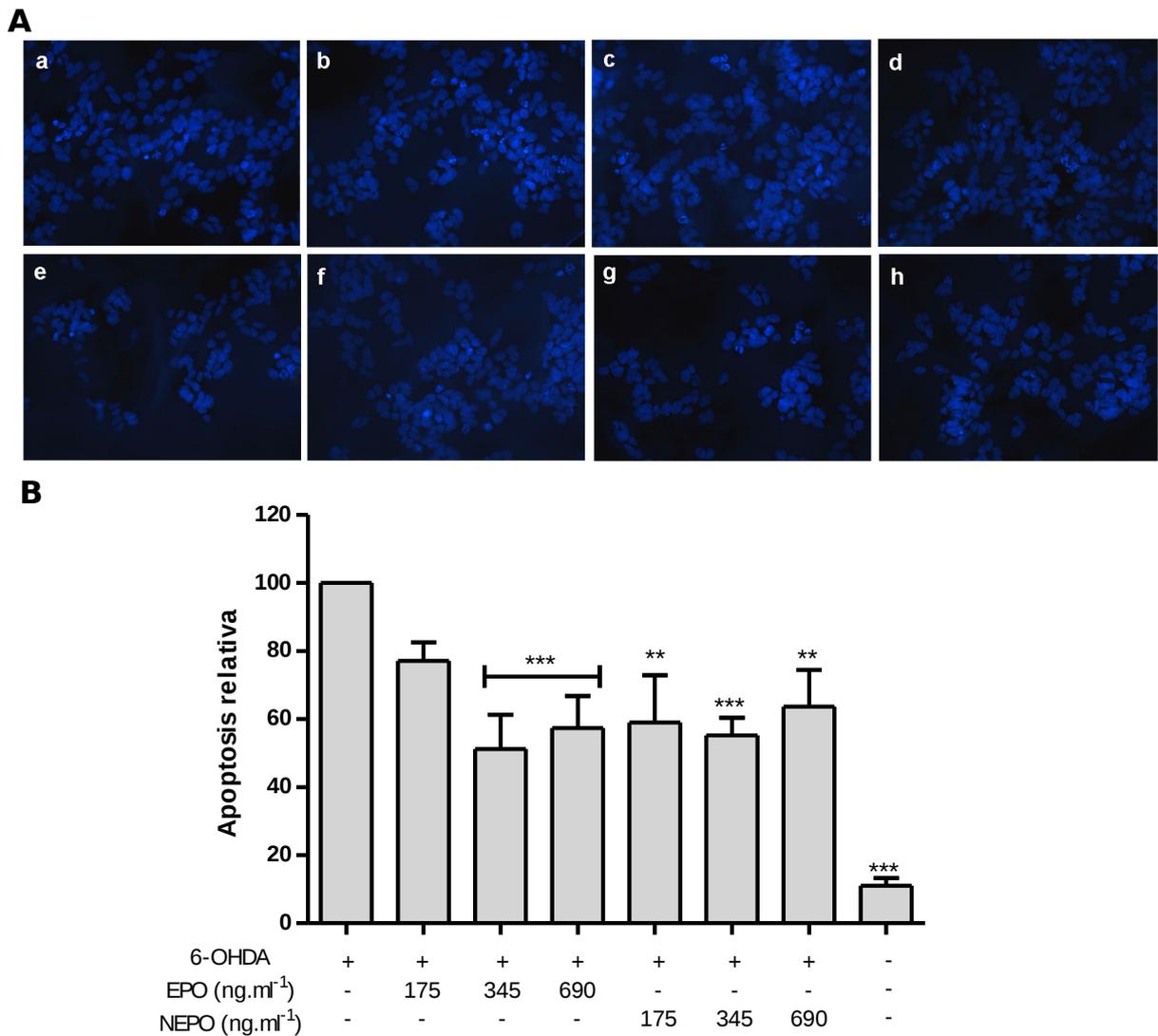


Fig. 45. Efecto protector de la rhNEPO sobre las células SH-SY5Y sometidas a apoptosis con 6-OHDA 100 μ M durante 4h.

- A.** Imágenes obtenidas luego de teñir las células con el colorante Hoechst 33258, a: células tratadas con 6-OHDA, b, c y d: células tratadas con rhEPO (175, 345 y 690 ng.ml⁻¹, respectivamente) y 6-OHDA, f, g, h: células tratadas con rhNEPO (175, 345 y 690 ng.ml⁻¹, respectivamente) y 6-OHDA y e: células sin tratar, control de crecimiento.
- B.** El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante el recuento de aproximadamente 500 células. Los valores se expresan como apoptosis relativa al control de muerte. Grado de significancia estadística: *** $p \leq 0,001$ y ** $p \leq 0,05$ comparados con el grupo sometido a apoptosis sin ningún tratamiento (n=3). Test ANOVA y post-ANOVA test de Tukey.

30.2 Rol antiapoptótico de la nueva variante en cultivo primario de neuronas corticales de rata

La posibilidad de evaluar el efecto antiapoptótico de las variantes de rhEPO sobre un cultivo primario de neuronas corticales permite estudiar el efecto de dichas drogas sobre células cuyo metabolismo no se encuentra alterado como en las líneas celulares establecidas. Por tal motivo, es un modelo interesante ya que se aproxima de una forma más real a lo que ocurriría *in vivo* en el cerebro. Además, la selección del cultivo de neuronas corticales fue hecha sobre la base de que estas células han mostrado la expresión del EPOR y han sido ampliamente utilizadas para estudiar el efecto neuroprotector de la EPO ([Andoh y col., 2011](#); [Digicaylioglu y col., 1995](#); [Morishita y col., 1997](#); [Ruscher y col., 2002](#); [Taoufik y col., 2008](#)).

Para evaluar el efecto de las variantes de rhEPO en este modelo, lo primero que se determinó fue el porcentaje de neuronas presentes en los cultivos primarios generados con el fin de corroborar si la metodología empleada para obtener las neuronas corticales había sido apropiada. Para poner en evidencia la cantidad de neuronas presentes en el cultivo se evaluó la presencia de la proteína MAP2 mediante inmunofluorescencia, dado que ésta corresponde a una serie de proteínas asociadas a microtúbulos exclusiva de células nerviosas. Simultáneamente, se analizaron los cambios a nivel de la condensación de la cromatina mediante tinción del ADN con el fluorocromo Hoechst 33258.

Tal como se procedió para las células SH-SY5Y, en primer lugar, se seleccionó la concentración de CoCl_2 que permitiese obtener una diferencia significativa entre el control de crecimiento y el control de muerte luego de incubar las células durante 24 horas en presencia de dicho agente.

Con ese fin, las células obtenidas de la corteza cerebral de ratas de 1 día de edad se sembraron a una densidad de $1,0-1,6 \cdot 10^5$ cél.cm⁻² y se diferenciaron durante 7 días manteniéndolas en el medio Neurobasal suplementado con B27, L-glutamina y antibióticos. Posteriormente, se indujo apoptosis durante 24 h mediante el agregado de diferentes concentraciones de CoCl_2 (0, 100, 200, 400 y 600 μM).

Antes de discutir el efecto de las distintas concentraciones, es importante destacar que se obtuvieron cultivos con un 74 ± 6 % de neuronas corticales, calculado al superponer las imágenes inmunomarcadas con el anticuerpo anti-MAP2 conjugado con fluoresceína y coloreadas simultáneamente con el reactivo Hoechst (Ver Fig. 46). Esta metodología al mismo tiempo permitió visualizar claramente la presencia de dendritas e interconexiones entre las neuronas, lo que puso en evidencia que luego de 7 días las células se diferenciaron correctamente.

El efecto de las diversas concentraciones de CoCl_2 se puede observar en la Fig. 47A. Como se pone en evidencia en la curva dosis-respuesta, recién a partir de los $400 \mu\text{M}$ la diferencia con el control de crecimiento (sin CoCl_2) fue significativa ($22,6 \pm 3\%$ y $13,1 \pm 1\%$, respectivamente), mientras que entre 400 y $600 \mu\text{M}$ no existieron diferencias significativas, alcanzando un porcentaje de células apoptóticas del $22,6 \pm 3 \%$ y $23,1 \pm 1,5 \%$, respectivamente. Entre ambas concentraciones, se seleccionó $600 \mu\text{M}$ de CoCl_2 para evaluar el efecto de las variantes de rhEPO.

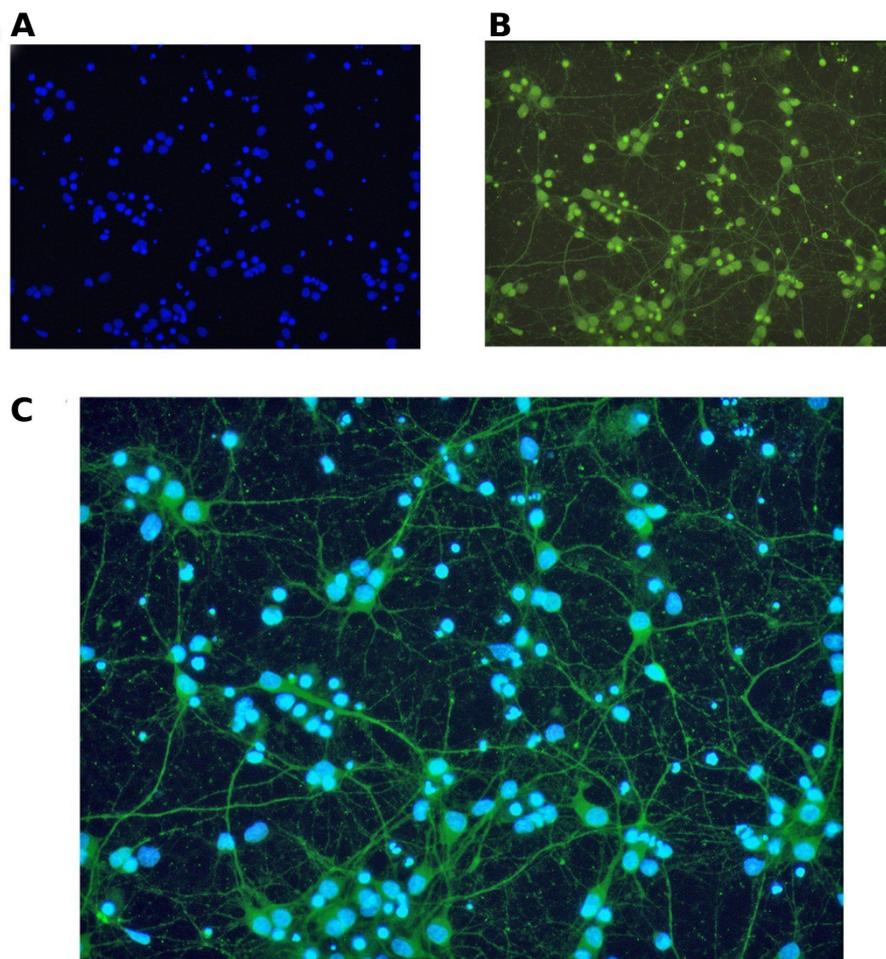


Fig. 46. Evaluación de la diferenciación neuronal.

- A. Imagen de las células del control de crecimiento coloreadas sólo con el colorante Hoechst.
- B. Imagen de las células marcadas con anti-MAP2 conjugado con fluoresceína.
- C. Superposición de las imágenes A y B.

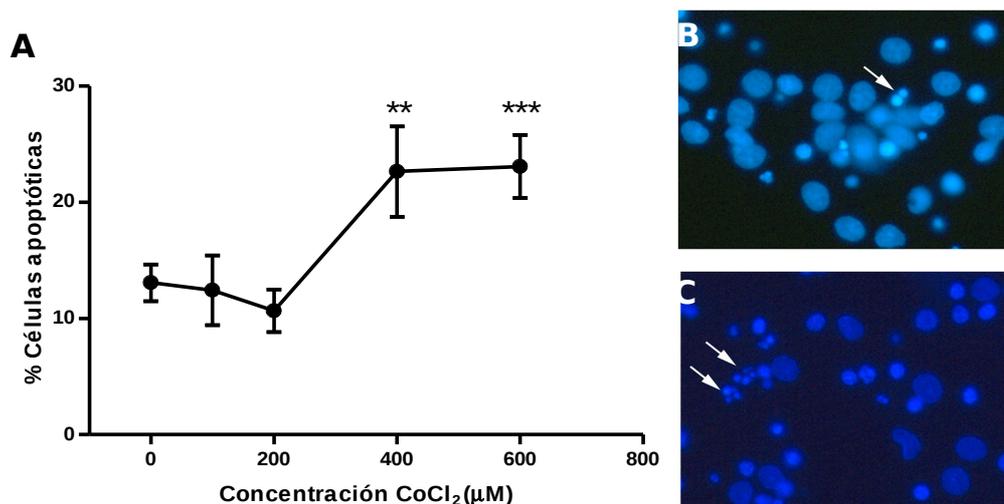


Fig. 47. Efecto de diferentes concentraciones de CoCl₂ sobre la muerte celular en cultivo primario de neuronas corticales.

A. Curva dosis-respuesta (n=3).

B. Control de crecimiento.

C. Células tratadas con 600 μM de CoCl₂. Grado de significancia estadística: *** p ≤ 0,001 y ** p ≤ 0,01 comparados con el grupo control (sin agregado de CoCl₂). Test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey.

Continuando con la premisa de que para que la rhEPO cumpla su rol citoprotector requiere de pretratamiento, las células fueron tratadas durante 24 h con 395 ng.ml⁻¹ de la nueva molécula y de la rhEPO (50 UI.ml⁻¹).

Una vez transcurrido dicho tiempo, las células fueron expuestas a 600 μM de CoCl₂ durante 24 h en presencia de las moléculas y, finalmente, fueron fijadas y coloreadas con el fluorocromo Hoechst.

En la Fig. 48, se observa que el tratamiento con ambas moléculas redujo significativamente la apoptosis respecto del control de muerte. Sin embargo, a la misma masa, la rhNEPO fue significativamente más efectiva que la rhEPO ya que disminuyó el número de células apoptóticas en un 40 % mientras que la rhEPO sólo en un 25 %, con respecto al mismo control.

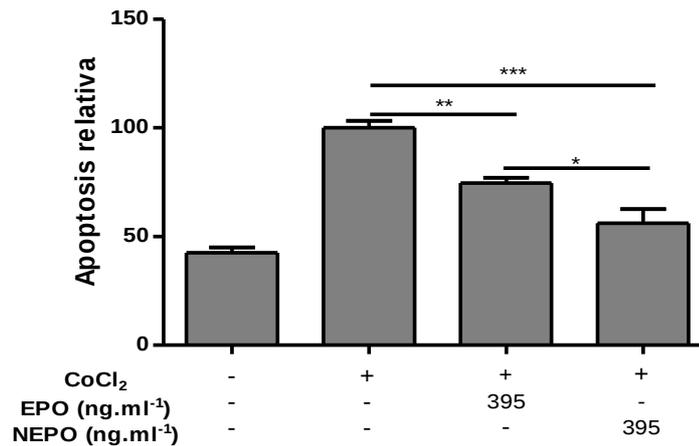


Fig. 48. Efecto protector de la rhNEPO sobre el cultivo primario de neuronas corticales sometidas a apoptosis con CoCl₂ 600 μM durante 24h.

El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante el recuento de ~ 500 células. Los valores se expresan como apoptosis relativa al control de muerte. Grado de significancia estadística: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ y * $p \leq 0,05$ comparados con el grupo sometido a apoptosis sin ningún tratamiento (n=3). Test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey.

Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados *in vitro* empleando un cultivo primario de neuronas donde se ha mostrado que la rhEPO protege las células de la muerte celular inducida por hipoxia o por glutamato ([Juul y col., 1998](#); [Morishita y col., 1997](#); [Xu y col., 2009](#)).

En condiciones de hipoxia se ha demostrado que se genera un incremento de glutamato ([Morishita y col., 1997](#); [Nicotera y Lipton, 1999](#)). Por lo tanto, considerando que el inductor de apoptosis empleado en este modelo fue el CoCl₂, un inductor químico de hipoxia, se podría suponer que uno de los mecanismos responsables de este efecto neuroprotector observado por parte de las variantes de rhEPO estaría relacionado con las propiedades antineurotóxicas reportadas para la hormona hematopoyética.

[Xu y col. \(2009\)](#) postularon que el modo de acción de la rhEPO para prevenir el daño hipóxico inducido en neuronas corticales probablemente proceda de su potencial para prevenir la liberación de glutamato así como también atenuando la excitotoxicidad mediada por el receptor NMDA (N-metil-(D)-aspartato). Otro posible mecanismo propuesto podría estar relacionado con la modulación inducida por EPO del flujo de calcio intracelular inducido por glutamato, pero aún no está dilucidado completamente. Estudios recientes sugieren que la EPO actuaría disminuyendo la entrada de calcio a la célula en condiciones de excitotoxicidad ([Andoh y col., 2011](#)).

Por otro lado, se ha demostrado que el CoCl_2 en otros cultivos celulares disminuye la expresión de la proteína Bcl-2, una de las principales proteínas antiapoptóticas, e induce apoptosis a través de la activación de proteínas kinasas y de caspasas (Akita y col., 2007). Asimismo, las propiedades antiapoptóticas de la EPO, evidenciada en un gran número de líneas celulares y cultivos primarios, están asociadas con la capacidad no sólo para regular la relación Bcl-2/Bax sino también para disminuir la expresión del gen Bak e incrementar la expresión de Bcl-X_L. Por lo tanto, se podría postular a este mecanismo molecular como otra vía a través de la cual la nueva variante de rhEPO podría estar ejerciendo su acción.

Cabe destacar que para corroborar esta hipótesis sería necesario profundizar el estudio analizando los mecanismos moleculares mencionados, dado que no se ha evaluado hasta el momento el efecto antiapoptótico de la rhEPO empleando este inductor.

30.3 Rol antiapoptótico de la nueva variante en cultivo de células PC-12 diferenciadas con NGF durante 7 días.

Con el fin de evaluar el efecto antiapoptótico de la rhNEPO en esta línea celular diferenciada, se decidió estudiar otra característica importante de la apoptosis a nivel nuclear, que es la fragmentación del ADN. Este cambio es el paso final de la cadena de eventos que desencadena un proceso apoptótico. Existe un gran número de metodologías que permiten su marcación. En esta oportunidad, se optó por un método que permita analizar esta degradación individualmente en cada célula, el cual se conoce como técnica de TUNEL. Para llevar a cabo este estudio, las células se sembraron a una densidad de $1,5 \cdot 10^4$ cél.cm⁻² y luego se diferenciaron en presencia del factor neurotrófico durante 7 días (en la Fig. 49B y 49C se puede observar la presencia de neuritas). Considerando los resultados obtenidos en el bioensayo de viabilidad celular, se decidió tratar las células con $37,5 \text{ ng.ml}^{-1}$ (5 UI.ml^{-1}) de cada variante de rhEPO durante 24 h y luego desencadenar la apoptosis durante 24 h mediante supresión del suero y el NGF del medio de cultivo.

En las condiciones ensayadas se observó una diferencia importante entre el control de crecimiento y el control de muerte de aproximadamente un 75%. En cuanto al efecto de las moléculas, ambas fueron capaces de disminuir el porcentaje de células apoptóticas entre 40 y 60% respecto del control que no recibió ninguna variante de rhEPO pero fue sometido al estímulo apoptótico (Fig. 49A).

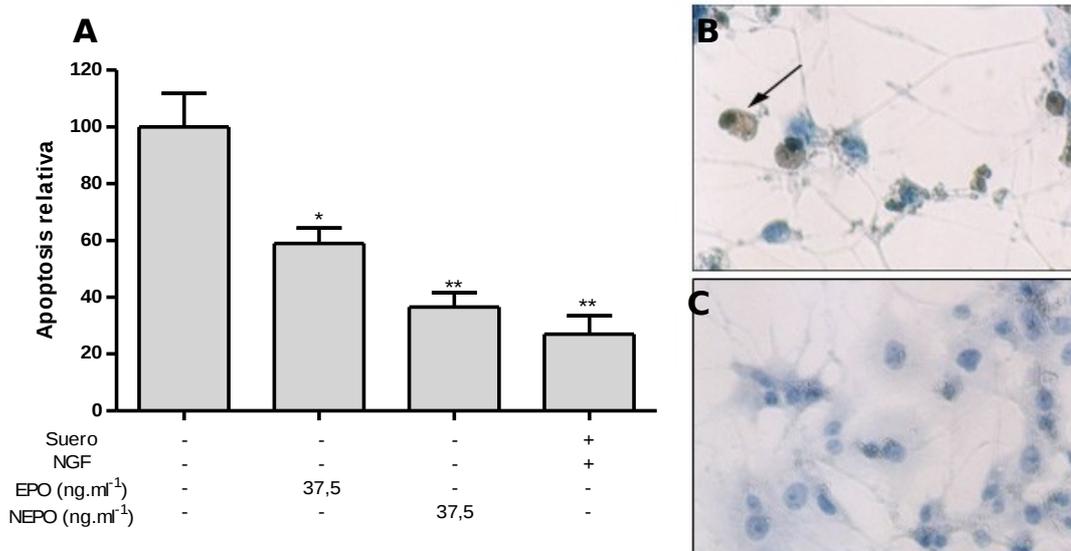


Fig. 49. Efecto protector de la rhNEPO sobre las células PC-12 diferenciadas sometidas a apoptosis por supresión de suero y NGF durante 24 h.

- A.** El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante el recuento de ~ 500 células. Los valores se expresan como apoptosis relativa al control de muerte celular. Grado de significancia estadística: ** $p \leq 0,01$ y * $p \leq 0,05$ comparados con el grupo sometido a apoptosis sin ningún tratamiento ($n=3$). Test ANOVA y test post-ANOVA de Tukey.
- B.** Células privadas de suero y NGF, la flecha negra indica una célula apoptótica (marrón).
- C.** Células viables, control.

Estos resultados corroboraron lo observado mediante el ensayo de viabilidad celular realizado con estas células, comprobando que la rhNEPO actúa de igual manera que la rhEPO.

Si se considera que durante la necrosis también existe fragmentación del ADN, se puede pensar que este método no sería de utilidad. Sin embargo, si además de la marcación se observan las células al microscópico como se hizo en esta oportunidad, se podría asegurar que la muerte se está ocasionando por el proceso de apoptosis ya que en caso contrario se observaría un incremento del tamaño celular debido a que la célula pierde el control de la permeabilidad de la membrana plasmática y, en consecuencia, se establece un flujo anormal de iones hacia el interior celular que va acompañado de la entrada pasiva de agua provocando el hinchamiento de las células (Díaz Martín, 2006).

A pesar de que en este trabajo sólo se evaluó qué ocurría a nivel del núcleo celular, fase de ejecución de la apoptosis, ha sido ampliamente reportado que el efecto antiapoptótico de la rhEPO está dado especialmente por la regulación de la expresión

de diversos genes involucrados en la apoptosis, principalmente los pertenecientes a la familia de Bcl-2 en ambas líneas celulares evaluadas, PC-12 y SH-SY5Y ([Li y col., 2008](#); [Pregi y col., 2006](#); [Pregi y col., 2009](#); [Renzi y col., 2002](#); [Um y col., 2007](#); [Wenker y col., 2010](#)). En consecuencia, teniendo presente que la única diferencia entre la rhEPO y la rhNEPO está dada por el contenido de ácido siálico terminal y que el efecto de la nueva variante observado sobre ambas células fue igual o mayor al de la rhEPO, se podría inferir que el mecanismo de acción de ambas moléculas sería el mismo.

31. ANÁLISIS DE LA FARMACOCINÉTICA EN PLASMA DE LA rhNEPO Y LA rhEPO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Como se demostró anteriormente, la rhNEPO presenta un perfil de carbohidratos diferente al de la rhEPO, con un marcado incremento de cadenas bi-antenarias y un menor contenido de ácido siálico. Estas características no sólo afectan la actividad biológica *in vitro* sino también la farmacocinética de las drogas, que se ve reflejada en la actividad biológica *in vivo*. Por ende, conociendo la importancia de los carbohidratos sobre las propiedades biológicas de las glicoproteínas se propuso evaluar el efecto de las características fisicoquímicas de la rhNEPO sobre sus parámetros farmacocinéticos.

Para tal fin, se realizaron ensayos *in vivo* utilizando animales de experimentación en comparación con la hormona hematopoyética, y se evaluaron diferentes vías de administración: intra y extravascular. Los animales fueron inyectados con una dosis de cada molécula (500 µg, por vía endovenosa e intraperitoneal, y 200 µg, por vía subcutánea). La cuantificación de las variantes de rhEPO presentes en las distintas muestras obtenidas luego de diferentes tiempos post-inoculación se realizó mediante la técnica de ELISA. Los resultados obtenidos se graficaron en función del tiempo transcurrido desde su administración (Fig. 50).

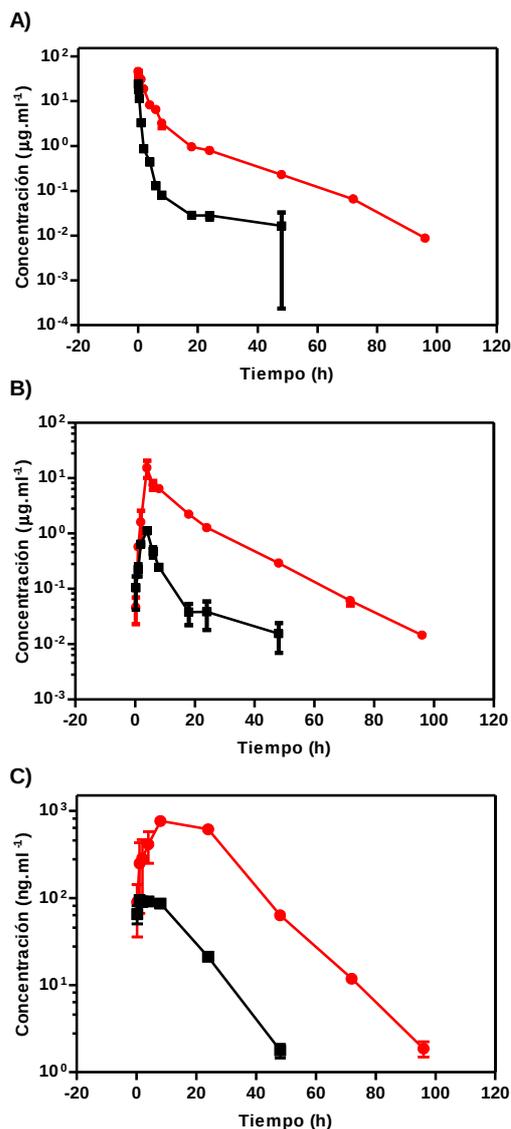


Fig. 50. Perfil farmacocinético de las variantes de rhEPO luego de su administración por diferentes vías. A) endovenosa, B) intraperitoneal y C) subcutánea.

Se graficó la concentración plasmática de la rhEPO (●) y la rhNEPO (■) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (n=2, para A y B y n=3 para C).

Luego de la administración endovenosa, el perfil bifásico de la concentración plasmática en el tiempo obtenido para ambas moléculas analizadas permitió ajustar el comportamiento de las mismas a un modelo de dos compartimientos con una fase de distribución (remoción desde el compartimiento central hacia el periférico) y una fase de eliminación (depuración hacia el exterior del organismo) claramente distinguibles (Fig. 50). Los parámetros que caracterizan la cinética de las moléculas mediante esta vía de administración se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros farmacocinéticos de las variantes de rhEPO luego de su administración endovenosa en ratas

Variante de rhEPO	$t_{1/2\alpha}$ (h)*	$t_{1/2\beta}$ (h)*	CL (ml.h ⁻¹)*	(V _d) _{ss} (ml)*
rhNEPO	0,38 ± 0,04	8,89 ± 0,40	31,59 ± 1,94	66,91 ± 3,05
rhEPO	1,67 ± 0,05	12,35 ± 0,93	3,33 ± 0,30	26,99 ± 4,24

* p ≤ 0,05, test de Student.

Para el caso de las vías extravasculares, como la farmacocinética es más difícil de modelar debido a que hay que tener en cuenta la absorción sistémica del fármaco desde el sitio de administración hacia el plasma y a la amplia variabilidad entre los individuos, se seleccionó un análisis no compartimental para los datos obtenidos. En la Tabla 7, se presentan los parámetros farmacocinéticos que caracterizan cada una de las vías de administración extravascular evaluadas.

Tabla 7: Parámetros farmacocinéticos de las variantes de rhEPO luego de su administración extravascular en ratas.

Vías administración	Variante de rhEPO			
	rhNEPO		rhEPO	
	IP	SC	IP	SC
T _{max} (h)	4,00 ± 0,00	4,33 ± 3,51	4,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
C _{max} (µg.ml ⁻¹)	1,11 ± 0,06	0,11 ± 0,01 ^{▲▲}	15,35 ± 7,57	0,76 ± 0,08
TMR _{ev} (h)	9,48 ± 1,41	11,10 ± 0,73 ^{***}	13,55 ± 0,91	19,46 ± 1,18
TMA (h)	7,36 ± 1,41	8,98 ± 0,73*	5,47 ± 0,91	11,38 ± 1,18
CL _{app} (ml.h ⁻¹)	70,53 ± 0,81 ^{***}	108,60 ± 9,36 ^{▲▲}	3,85 ± 0,85	8,46 ± 0,60
F (%)	44,80 ± 0,51	29,23 ± 2,41 ^{**}	88,72 ± 19,58	39,50 ± 2,85

IP: vía intraperitoneal, SC: vía subcutánea, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 según test t de Student y ▲▲ p ≤ 0,01, según test t de Student con la corrección de Welch, para parámetros con varianzas iguales o de desiguales, respectivamente. Las diferencias indicadas se refieren a las diferencias entre las moléculas en cada vía de administración estudiada.

Para todas las vías de administración, la concentración plasmática de rhNEPO y rhEPO disminuyó a valores indetectables luego de 48 y 96 h, respectivamente. En cuanto a la vía endovenosa, se puede ver que tanto el tiempo de distribución y el tiempo de eliminación medio de la rhNEPO fueron significativamente inferiores al de la rhEPO. Por otra parte, en términos del *clearance* total, la rhNEPO fue depurada 10

veces más rápido que la rhEPO y el volumen de distribución en estado estacionario para esta nueva variante fue aproximadamente 2,5 veces mayor que el de la hormona hematopoyética.

Este comportamiento era esperable debido a la menor proporción de carbohidratos y ácido siálico terminal. Se ha demostrado que el ácido siálico prolonga la vida media en circulación plasmática de las proteínas evitando la filtración glomerular a través de un incremento de la carga negativa de la molécula ([Goochee y col., 1991](#)) y retarda la unión a los receptores de las asialoglicoproteínas presentes en el hígado ([Morell y col., 1971](#)). Además, la menor antenaridad de los carbohidratos observada para la rhNEPO comparada con la de la rhEPO resulta en un menor volumen hidrodinámico que contribuye a incrementar el *clearance* renal. En un estudio realizado por [Misaizu y col. \(1995\)](#), en el que se evaluó el efecto de las ramificaciones de carbohidratos presentes en la rhEPO, observaron que una variante denominada EPO-bi, que presentaba mayor proporción de carbohidratos bi-antenarios, era más rápidamente dirigida al riñón que la rhEPO control.

Por lo tanto, si bien hasta el momento no se ha esclarecido cual es el principal mecanismo involucrado en la degradación de la eritropoyetina plasmática, se puede afirmar que las vías hepática y renal participan en la depuración de la EPO circulante, así como el catabolismo de la EPO por el consumo mediado por los receptores y la degradación en el tejido eritropoyético ([Jelkmann, 2002](#)).

A los fines de complementar el estudio endovenoso se analizaron las vías de administración extravasculares y se observó un comportamiento análogo en el *clearance*. Si se compara la velocidad aparente de depuración de la rhNEPO para cada vía de administración, se puede notar que luego de la inoculación intraperitoneal esta nueva combinación fue depurada 18 veces más rápido que la rhEPO mientras que por vía subcutánea fue significativamente inferior, siendo 12 veces mayor al observado para la hormona hematopoyética.

Al analizar lo que ocurre a nivel de absorción de las drogas, se observó que por ambas vías extravasculares estas moléculas no mostraron diferencias significativas en el T_{max}. Sin embargo, si se analiza en forma comparativa lo que ocurre con este parámetro para cada molécula en las vías estudiadas, se puede ver que la rhNEPO no presenta diferencias entre la vía subcutánea e intraperitoneal mientras que la rhEPO sí. Este comportamiento de la hormona eritropoyética ya había sido reportado por [Statler y col. \(2007b\)](#), quienes lo atribuían tanto a una diferencia en la fracción absorbida y a la velocidad de absorción como a una posible absorción incompleta o degradación de la rhEPO en el sitio de inoculación subcutánea. Como se puede observar en la tabla 7, el TMA de absorción para rhEPO aumentó significativamente

luego de la administración subcutánea, siendo concordante con lo observado por estos autores.

Por otra parte, la similitud del Tmax de la rhNEPO entre ambas vías extravasculares también se reflejó en el TMA, poniendo en evidencia que el proceso de absorción de la rhNEPO no ha sido afectado por el sitio de inoculación. Es importante tener presente que tanto la velocidad de absorción como la fracción absorbida dependen de las características fisicoquímicas del fármaco, de las características del preparado y de los factores fisiológicos del individuo. Entre las características fisicoquímicas que influyen sobre la velocidad de transporte a través de las membranas celulares se encuentran la masa molecular, la liposolubilidad y el grado de ionización de la droga ([Galinsky y Svensson, 1995](#)). Por lo tanto, el menor tamaño y la inferior carga neta de la rhNEPO podrían estar favoreciendo la absorción desde el sitio de administración permitiendo que la absorción a través de ambas vías sea similar y, particularmente para el caso de la vía subcutánea, sea significativamente menor el TMA con respecto a la rhEPO.

Al analizar la biodisponibilidad se puede ver que si bien para el caso de la rhNEPO la fracción de dosis administrada por cualquiera de las vías no supera el 45%, la vía de administración intraperitoneal permite que una mayor fracción de la dosis administrada llegue al torrente sanguíneo luego de los procesos de absorción y distribución. Esto se debe principalmente a que el área de absorción es mayor para la vía intraperitoneal que para la vía subcutánea. La menor biodisponibilidad observada para la rhNEPO en comparación con la rhEPO era esperable debido a que la misma no sólo está afectada por el proceso de absorción sino también por las propiedades fisicoquímicas de la molécula que, como se explicó anteriormente, afectan directamente la fase de eliminación de esta nueva variante.

32. EVALUACIÓN DEL TRASPASO DE LA BARRERA HEMÁTOENCEFÁLICA DE LA rhNEPO Y LA rhEPO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Durante mucho tiempo se consideró que, debido al tamaño molecular, al nivel de glicosilación y a la carga superficial de la EPO, la misma no era capaz de atravesar la barrera hematoencefálica ([Buemi y col., 2000](#); [Digicaylioglu y col., 1995](#); [Marti y col., 1997](#)). Sin embargo, un gran número de estudios posteriores demostraron que la EPO administrada en forma sistémica era detectada en el líquido cefalorraquídeo de distintas especies animales y en humanos luego de su aplicación endovenosa ([Brines y Cerami, 2008](#); [Brines y col., 2000](#); [Ehrenreich y col., 2004](#); [Erbayraktar y col., 2003](#); [Juil y col., 2004](#); [Statler y col., 2007a](#)). Por lo tanto, con la finalidad de evaluar si las

características fisicoquímicas diferenciales de la rhNEPO con respecto a la rhEPO afectaban su capacidad para atravesar la BHE (intacta o luego de una permeabilización osmótica), se realizó la caracterización farmacocinética de ambas drogas en el líquido cefalorraquídeo luego de la administración de una dosis por vía endovenosa (intacta y con permeabilización osmótica) y extravascular (intacta).

32.1 Traspaso de la barrera hematoencefálica de la rhNEPO y rhEPO luego de la administración endovenosa e intraperitoneal

32.1.1 Barrera hematoencefálica intacta

En el hallazgo de una potencial droga para el tratamiento de enfermedades asociadas al sistema nervioso central es de gran interés determinar si la misma es capaz de alcanzar y distribuirse por dicho sistema, ya que esto suele ser un obstáculo en el desarrollo de nuevos medicamentos. Una herramienta importante para establecer si una nueva droga tiene la capacidad de ingresar al SNC es el muestreo del LCR y su cuantificación en dicho fluido. Esta determinación es particularmente interesante ya que no sólo presenta un enfoque práctico en términos de esfuerzo, costo y rendimiento sino que, además, es útil para dilucidar el tiempo que tarda el medicamento en alcanzar el SNC y cumplir su efecto farmacológico. Su uso se basa en la suposición de que la concentración en el LCR representa la concentración de droga no unida en el cerebro cuando se alcanza el equilibrio en estado estacionario de la concentración del fármaco libremente difusible en todo el cerebro, independientemente de si hay uno o múltiples sitios de distribución (Shen et al., 2004). Esta hipótesis considera que el cerebro presenta características cinéticas de un compartimiento homogéneo en estado estacionario.

Para llevar a cabo este estudio se realizó la extracción de LCR, antes de realizarle la extracción de sangre, a los animales de experimentación que recibieron una dosis de 500 µg de las variantes de rhEPO por vía endovenosa e intraperitoneal. De esta manera, se puede correlacionar la concentración plasmática de la variante obtenida para cada tiempo con su concentración en LCR. Una vez recolectadas las muestras, se realizó la cuantificación de las moléculas mediante ELISA sándwich amplificado y los valores de concentración obtenidos para cada vía de administración se graficaron en función del tiempo (Fig. 51).

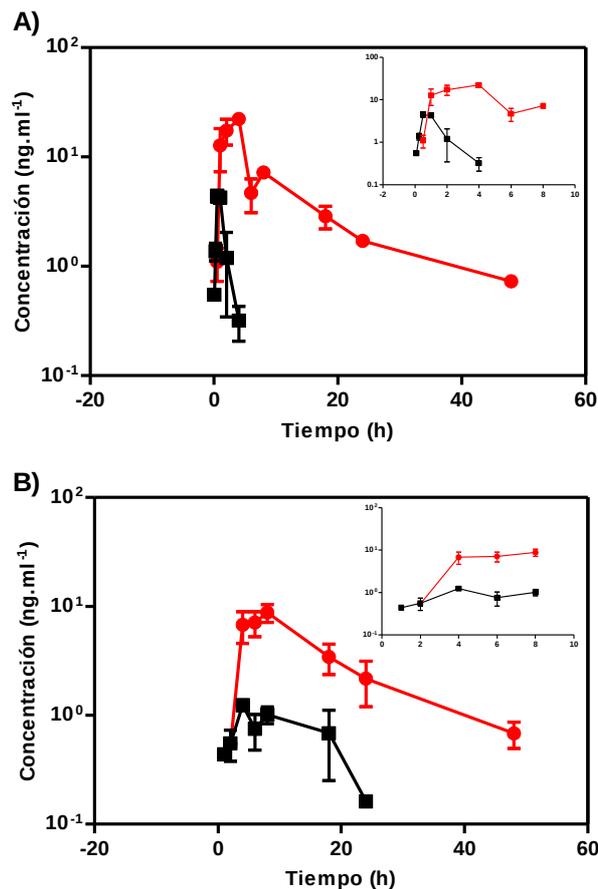


Fig. 51. Perfil farmacocinético de las variantes de rhEPO en LCR luego de su administración por diferentes vías. A) endovenosa, B) intraperitoneal.

Se graficó la concentración en LCR de la rhEPO (●) y la rhNEPO (■) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados se muestran como el promedio \pm SD ($n=2$). El gráfico representado en el esquema superior derecho en A y B, muestra los datos obtenidos entre 0 y 8 horas.

Como se puede observar en la Fig. 51, las curvas obtenidas para cada molécula presentaron un perfil farmacocinético difícilmente ajustable a un modelo compartimental y, a su vez, una amplia variabilidad entre animales por lo que se decidió realizar el cálculo de los parámetros farmacocinéticos aplicando un análisis no compartimental de los datos. Los parámetros calculados para cada molécula y para cada vía de administración se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros farmacocinéticos en LCR de las variantes de rhEPO luego de su inyección endovenosa (IV) e intraperitoneal (IP) en ratas.

Vías administración	Variante de rhEPO			
	rhNEPO		rhEPO	
	IV	IP	IV	IP
T_{max} (h)	0,50 ± 0,00*	4,00 ± 0,00*	4,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
C_{max} (ng.ml ⁻¹)	4,46 ± 0,61**	1,24 ± 0,16*	22,28 ± 0,82	8,79 ± 1,65
TMR _{ev} (h)	1,40 ± 0,17*	13,48 ± 0,97	15,16 ± 3,19	18,93 ± 2,36
ABC (ng.(ml.h) ⁻¹)	7,74 ± 2,17**	19,42 ± 3,10*	202,46 ± 13,81	163,90 ± 31,97

IP: vía intraperitoneal, IV: vía endovenosa, * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$, según test t de Student.

Empleando la vía de administración intravascular, ambas variantes de rhEPO fueron capaces de atravesar la BHE, siendo la rhNEPO detectada en el LCR luego de 5 minutos post-inoculación a concentraciones suficientemente altas como para unir al receptor EPOR ([Erbayraktar y col., 2003](#)). El pasaje de la rhNEPO a través de la BHE fue más rápido que el de rhEPO, la cual no aparece en el LCR hasta los 30 min posteriores a la administración. Sin embargo, fue eliminada más lentamente de circulación. Si se compara el tiempo al cual cada molécula fue capaz de alcanzar su máxima concentración se puede ver que la rhNEPO lo hizo a los 30 min, mientras que la rhEPO recién fue capaz de lograrlo a las 4 h. Dado que la velocidad de depuración plasmática de cada molécula fue significativamente diferente (Tabla 6), se calculó una relación entre la máxima concentración alcanzada en el LCR y la máxima concentración plasmática para cada molécula con la finalidad de poder realizar la comparación entre ambas. En concordancia con datos bibliográficos ([Xenocostas y col., 2005](#)), la máxima concentración en LCR de rhNEPO y rhEPO fue 0,02% y 0,05% de la máxima concentración plasmática, respectivamente.

Estos hallazgos son consistentes con un gran número de estudios en los que se demostró que la EPO administrada en forma sistémica era detectada en el LCR ([Brines y Cerami, 2008](#); [Brines y col., 2000](#); [Ehrenreich y col., 2004](#); [Erbayraktar y col., 2003](#); [Juul y col., 2004](#); [Statler y col., 2007a](#)). Sin embargo, el mecanismo de transporte de esta hormona hacia el SNC hasta el momento resulta controversial. Por un lado, estudios realizados por [Brines y col. \(2000\)](#) demostraron claramente que la EPO podía ser traslocada al cerebro atravesando el endotelio capilar mediado por un transportador específico y saturable. Para este transporte se identificaron dos tipos de EPOR (clásico homodímero y receptor heteromérico, Apartado introducción Fig. 10) en

las células del endotelio capilar. De este modo, la EPO o sus análogos podrían unirse a los mismos iniciando la endocitosis seguida por la traslocación al cerebro. Considerando esta hipótesis, el transporte de la rhNEPO podría ser facilitado dado que, como se demostró en este trabajo de tesis, esta molécula exhibió mayor afinidad que la rhEPO por el EPOR en algunas líneas celulares *in vitro*. En contraste, [Banks y col. \(2004\)](#) concluyeron que la EPO atraviesa la BHE muy lentamente por una vía extracelular. En este caso, la baja carga negativa de la rhNEPO bajo condiciones fisiológicas podría explicar su mayor velocidad de ingreso al LCR (Fig. 51A).

Ahora bien, si se tiene en cuenta el *clearance*, se podría pensar que al ser tan rápido esta molécula no podría cumplir su efecto terapéutico en el tejido cerebral. Sin embargo, diferentes autores han demostrado que variantes de rhEPO con muy corta vida media plasmática evidenciaron un efecto citoprotector *in vivo*. Estos hallazgos pusieron en evidencia que una breve interacción de estas moléculas con el tejido dañado es suficiente para desencadenar la cascada de señalización intracelular que resulta en su efecto antiapoptótico ([Erbayraktar y col., 2003](#); [Morishita y col., 1997](#)). Uno de los ejemplos es la asialoeritropoyetina, un derivado de EPO obtenido por la desialidación enzimática total de la rhEPO, que presenta una muy corta vida media plasmática (1,4 min) y exhibe un amplio espectro de acciones neuroprotectoras *in vivo* ([Erbayraktar y col., 2003](#)). Otro de los casos lo constituye el péptido pH BSP constituido por 11 aminoácidos no adyacentes que se encuentran en la región de la hélice B de la hEPO expuesta al medio acuoso, el cual también posee una vida media plasmática extremadamente corta, pero que aún así exhibe un efecto equivalente a la hormona completa en modelos de isquemia cerebral y renal en ratas ([Brines y col., 2008](#)). Tomando en consideración estos antecedentes, se podría predecir que la rhNEPO sería capaz de alcanzar el parénquima cerebral sin ningún inconveniente luego de una administración endovenosa.

Por otra parte, luego de la administración intraperitoneal de las moléculas se obtuvieron resultados cualitativamente similares. Pero, en esta oportunidad, la rhNEPO fue detectada a los 60 min post-inoculación mientras que la rhEPO recién a las 2 horas, llegando a su máxima concentración a las 4 y 8 horas, respectivamente. Estos resultados obtenidos para la rhEPO están en concordancia con lo reportado por [Statler y col. \(2007a\)](#). Esto pone nuevamente en evidencia la capacidad de la nueva variante de rhEPO para ingresar más rápidamente al parénquima cerebral. Otro parámetro evaluado fue el TRM_{ev}, que en esta oportunidad no mostró diferencias significativas entre las moléculas. No obstante, la rhNEPO presentó una menor área bajo la curva (Tabla 9), que se relaciona con el mayor *clearance* plasmático observado.

Sin embargo, si se tiene en cuenta la relación entre concentración máxima alcanzada en el LCR y en el plasma, la rhNEPO alcanzó el 0,11% y la rhEPO 0,06%.

Otra comparación interesante que se puede realizar es entre los resultados obtenidos para cada vía de administración. Como se puede ver en la Tabla 9, ambas moléculas administradas por vía endovenosa alcanzaron una concentración máxima de aproximadamente 2,5 a 3,5 veces mayor que la lograda por vía intraperitoneal. No obstante, empleando esta vía de administración extravascular otros autores han demostrado una disminución de la muerte neuronal en la región CA1 del hipocampo con la asialoeritropoyetina que, como se mencionó anteriormente, presenta una rápida depuración plasmática ([Yamashita y col., 2010](#)). Por lo tanto, se supone que no habría inconvenientes para el empleo de la rhNEPO por esta vía de inoculación. Profundizando el estudio de lo que ocurre con la rhNEPO, se puede ver que luego de ser inoculada por vía extravascular, es detectada en líquido a partir de los 60 min y hasta las 24 h post-inoculación, mientras que por vía endovenosa desaparece luego de 4 h. Por consiguiente, para seleccionar cuál de las vías sería la más apropiada para su aplicación en patologías asociadas al SNC, se debe evaluar si conviene que las células afectadas en el individuo estén en contacto con una menor concentración durante más tiempo (vía intraperitoneal) o si se desea un efecto rápido capaz de alcanzar concentraciones superiores durante un tiempo menor, como ocurre luego de la inyección endovenosa.

32.1.2 Permeabilización osmótica de la BHE.

Dado que la permeabilidad de la BHE a la rhEPO y la rhNEPO es reducida, se evaluó si podría ser modificada luego de que dichas drogas fuesen administradas en presencia de una solución hiperosmolar de manitol.

Diversos autores han reportado que el uso de soluciones hiperosmolares de arabinosa ([Rapoport y col., 1972](#)) o manitol ([Brown y col., 2004](#); [Rapoport, 2000](#)) son capaces de incrementar la permeabilidad de BHE induciendo una contracción de las células endoteliales cerebrovasculares que conlleva a la disrupción de las delgadas uniones intracelulares ([Bellavance y col., 2008](#)). La metodología tradicional empleada para lograr la disrupción de la BHE involucra el uso de infusiones intraarteriales de las sustancias mencionadas, presentando la desventaja de ser un método muy invasivo. Por tal motivo, en este trabajo de tesis se decidió evaluar el efecto de la solución hiperosmolar de manitol administrada por vía endovenosa, considerando la ventaja de que involucra una intervención menor sobre el animal. A pesar de que esta vía ha sido menos investigada, existen documentos recientes en los que se reporta su utilización

para incrementar la entrega al SNC de factores neurotróficos, vectores virales y células ([McCarty y col., 2009](#); [Seyfried y col., 2008](#); [Yang y col., 2011](#)).

Con este fin, se emplearon animales de experimentación que fueron inoculados por vía endovenosa con 500 μg de cada variante en una solución de manitol 1,1M. Una vez transcurridos diferentes tiempos post-inoculación se realizó la extracción de LCR y sangre, y la cuantificación de las variantes en cada fluido se llevó a cabo mediante ELISA sándwich amplificado. En la Fig. 52 se muestra el perfil de concentración de cada molécula en presencia o ausencia de dicho polialcohol en función del tiempo post-inyección.

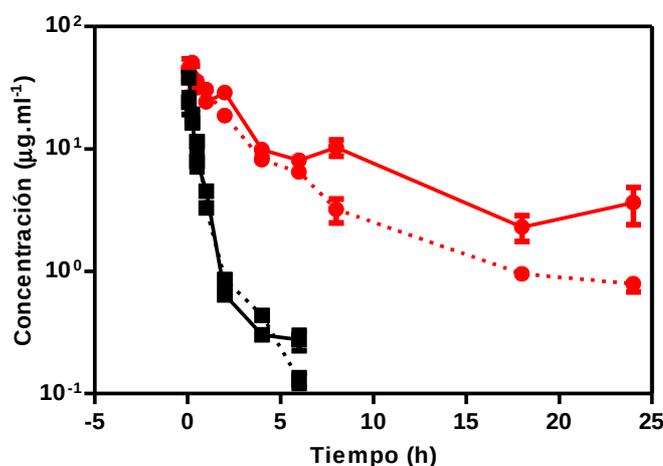


Fig. 52. Perfil farmacocinético de las variantes de rEPO luego de su administración por vía endovenosa en presencia (línea continua) o ausencia de manitol (línea punteada).

Se graficó la concentración plasmática de la rEPO (●) y la rhNEPO (■) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados se muestran como el promedio \pm SD (n=2).

Como se puede observar, la presencia de manitol no afectó significativamente la farmacocinética en plasma de las variantes en estudio. Sin embargo, si se observa lo ocurrido a nivel de LCR (Fig. 53), se puede notar que la rEPO administrada en la solución hiperosmolar fue detectada a los 5 min post-inoculación, alcanzando su máxima concentración a las 2 h, mientras que luego de la administración en solución salina recién fue detectada a partir de los 30 min y alcanzó el máximo a las 4 h. A pesar de esta diferencia en el T_{max}, cuando la rEPO se administró en solución salina no se observaron diferencias significativas en la concentración alcanzada entre las 2 y 4 horas. Por lo tanto, se podría suponer que la administración de la hormona en presencia de manitol sólo afecta la velocidad de ingreso al parénquima cerebral, permitiendo que la misma sea detectada más tempranamente en LCR, sin modificar el

tiempo al cual es alcanzada la C_{max} . Cabe destacar que, debido a que los parámetros T_{max} y C_{max} son determinados directamente de los datos observados por tratarse de un análisis no compartimental, es necesario ser cautelosos en su comparación.

Considerando que uno de los mecanismos propuestos para el pasaje de la rhEPO hacia el parénquima cerebral es a través de los espacios extracelulares ([Banks y col., 2004](#)), esta estrategia favorecería claramente el traspaso desde un fluido a otro, ya que disminuye la unión de las células endoteliales cerebrales facilitando de esta manera el transporte hacia el cerebro. Asimismo, si se tiene en cuenta el mecanismo de transporte propuesto por [Brines y col. \(2000\)](#), el empleo de esta solución hipertónica de manitol permitiría el pasaje simultáneo de la rhEPO a través de la vía mediada por receptores y la extravascular.

Un dato interesante que permite estimar en forma cuantitativa el incremento de dicho traspaso es el cálculo del ABC parcial entre 0 y 1h, en presencia o ausencia de manitol (Tabla 9). En este caso, como se muestra en la Tabla 9, el ABC_{0-1} no varió para la rhNEPO mientras que para la rhEPO se observó un incremento en este valor que no llegó a ser estadísticamente significativo.

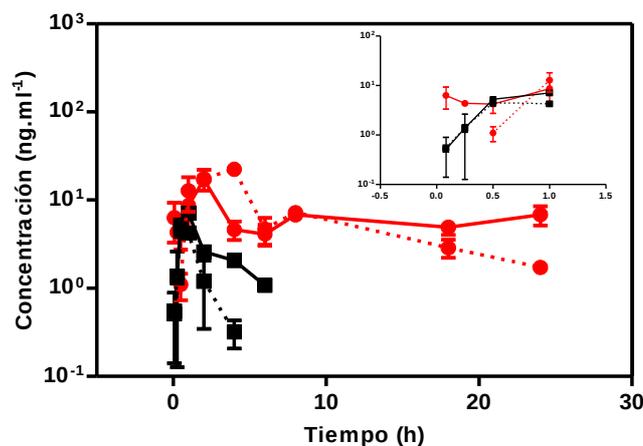


Fig. 53. Perfil farmacocinético de las variantes de rhEPO en LCR luego de su administración por vía endovenosa en presencia (línea completa) o ausencia de manitol (línea punteada), en animales de experimentación.

Se graficó la concentración en LCR de la rhEPO (●) y la rhNEPO (■) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados se muestran como el promedio \pm SD ($n=2$).

Al analizar el comportamiento de la rhNEPO, se puede notar que fue detectada a los 5 min post-inoculación, tal como había sido observado cuando se administró en solución salina. Sin embargo, la concentración máxima alcanzada fue significativamente mayor, aproximadamente 1,6 veces. Este comportamiento no fue

observado para la rhEPO. Si se tiene en cuenta el T_{max} , se observa que está desplazado 30 min con respecto al calculado cuando la rhNEPO fue administrada en ausencia de manitol. Sin embargo, en esa oportunidad si bien la C_{max} se alcanzó a los 30 min no se observaron diferencias significativas entre la concentración alcanzada a ese tiempo y a la hora. No obstante, como se comentó anteriormente para la rhEPO, hay que ser cauteloso al comparar este parámetro. Considerando estos resultados y analizando el área bajo la curva desde 0 hasta 1 h, en el que no se observaron diferencias significativas respecto de la administración en solución salina, se podría concluir que la aplicación del manitol en forma conjunta con la rhNEPO favorecería la transferencia, permitiendo que se alcance una mayor concentración en el parénquima cerebral.

Sin embargo, la relación de transferencia de la droga desde la circulación sanguínea al LCR se mantuvo prácticamente constante respecto de la administración sólo con solución salina, siendo 0,02% para rhNEPO y 0,04% para rhEPO.

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos en LCR de las variantes de rhEPO luego de su inyección endovenosa (IV).

Parámetros	Variante de rhEPO	
	rhNEPO	rhEPO
T_{max} (h)	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
C_{max} (ng.ml ⁻¹)	7,10 ± 0,48*	17,00 ± 1,41
(ABC iv con manitol) 0-1 h (ng.(ml.h) ⁻¹)	4,07 ± 0,06	5,15 ± 0,85 [▲]
(ABC iv en solución salina) 0-1 h (ng.(ml.h) ⁻¹)	3,07 ± 0,39	3,47 ± 1,26

* $p \leq 0,05$, test de *Student*, significativamente diferente a la C_{max} alcanzada en LCR en ausencia de manitol (ver Tabla 8) y [▲] $p \leq 0,05$, test de *Student*, significativamente diferente al ABC iv en solución salina.

33. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL.

El tejido cerebral es muy sensible a la isquemia por lo que aún cortos tiempos de privación de oxígeno pueden desencadenar una secuencia de eventos que culminan con la muerte neuronal. La isquemia cerebral se define como un proceso fisiopatológico caracterizado por la disfunción de una porción de tejido cerebral debido a la disminución o abolición del flujo sanguíneo en una arteria cerebral. Si el flujo se

recupera rápidamente existen elevadas probabilidades que sólo ocasione isquemia, pero si se suspende por varios minutos o en forma permanente, el daño será irreversible y el resultado será un infarto o muerte de una determinada área del cerebro. En la población mundial, cada año 15 millones de personas experimentan un accidente cerebrovascular y sólo aproximadamente un tercio de ellas no sufren discapacidades permanentes o, en caso extremo, la muerte ([Avezum y col., 2011](#)).

Además, se prevé que la cantidad de accidentes cerebrovasculares por año aumente dramáticamente a medida que la población envejece, y se ha estimado que los decesos relacionados con esta patología en América Latina casi se tripliquen para el año 2024 ([Avezum y col., 2011](#)). En Argentina hay aproximadamente unos 150.000 casos por año y la enfermedad demanda gastos de unos 434 millones de dólares, según un estudio publicado por [Christensen y col. \(2009\)](#).

Por lo tanto, la gran trascendencia social de la isquemia cerebral junto con el escaso número de tratamientos eficaces disponibles ponen en evidencia la necesidad del desarrollo de nuevos agentes neuroprotectores capaces de reducir las consecuencias derivadas de esta afección.

En la actualidad existe un gran número de modelos de accidente cerebrovascular isquémico que incluyen isquemia focal, isquemia global incompleta, isquemia global completa e isquemia multifocal ([Liu y McCullough, 2011](#)). Dado que la gran mayoría de los ACV registrados en seres humanos son consecuencia de la oclusión de una arteria cerebral principal, comúnmente la arteria cerebral media, los modelos de isquemia cerebral focal son de gran utilidad ya que permiten imitar lo que ocurre en humanos y constituyen una herramienta indispensable en el campo de la investigación y, fundamentalmente, en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

Por ese motivo, dado el potencial neuroprotector evidenciado por parte de la EPO en estudios *in vitro*, se han desarrollado innumerables modelos de isquemia cerebral transiente o permanente empleando diversos animales tales como gerbos, ratones, ratas, conejos ([Sargin y col., 2010](#); [Velly y col., 2010](#)), siendo en general las ratas el modelo de elección. La gran mayoría de estos estudios arrojaron resultados alentadores en el empleo de esta hormona hematopoyética como candidato para el tratamiento de esta patología. Sin embargo, estudios clínicos recientes que emplearon dosis de rhEPO como neuroprotector observaron un incremento significativo de la trombosis como efecto colateral, asociado con el rol hematopoyético de esta hormona, o riesgo de muerte y serias complicaciones cuando fue administrada en forma concomitante con el activador de plasminógeno tisular recombinante (rtPA) ([Velly y col., 2010](#)). Hasta el momento, la aplicación del mencionado activador, es la única estrategia farmacológica aprobada y en vigencia, y sólo está dirigida a restituir el flujo

sanguíneo cerebral obstruido ([Weimar y col., 2006](#)) pero no actúa sobre las neuronas dañadas por el efecto de la hipoxia.

Con la finalidad de evaluar si la rhNEPO obtenida presentaba un efecto neuroprotector similar al de la rhEPO en un modelo de isquemia cerebral focal, se emplearon ratones Balb/c de aproximadamente 1 mes a los que se los separó en 6 grupos de trabajo (Materiales y Métodos, Fig. 18) y se los sometió, en caso de corresponder al grupo isquémico, a una oclusión distal de la arteria cerebral media mediante electrocoagulación. Es importante destacar que, según los datos bibliográficos analizados, no existen reportes hasta la fecha del empleo de esta cepa de ratones para el estudio del efecto neuroprotector de la rhEPO llevando a cabo el modelo de isquemia desarrollado en esta tesis. Sin embargo, si existen trabajos publicados en los que se emplean otras cepas de ratones ([Bernaudin y col., 1999](#); [Li y col., 2007b](#)). Por lo tanto, este trabajo no sólo permitió evaluar esta hormona y la variante no hematopoyética en un nuevo modelo sino que también presentó un porcentaje de supervivencia de los animales del 100 % durante el desarrollo del experimento.

Es importante tener presente que la MCAO produce una isquemia gradual desde la corteza (isquemia leve) hasta los ganglios basales (isquemia severa), permitiendo el desarrollo de zonas de penumbra que rodean al núcleo isquémico, tal como se observa en la práctica clínica ([Hossmann, 2008](#)). Esto se debe a que los cambios hemodinámicos, metabólicos e iónicos que se desarrollan durante esta injuria no afectan al territorio isquémico de manera homogénea. En el centro o “core” del déficit de perfusión, el flujo sanguíneo cerebral se reduce 20% por debajo de lo normal. Las células mueren rápidamente por lipólisis, proteólisis y desagregación de los microtúbulos del citoesqueleto neuronal posterior al desajuste bioenergético, con la consiguiente alteración de la homeostasis iónica. Entre este core letalmente dañado y el tejido normal se establece la “penumbra”, una zona de flujo sanguíneo restringido con metabolismo energético parcialmente conservado. Esta zona sin tratamiento puede progresar a un infarto debido a la excitotoxicidad o a los fenómenos secundarios perjudiciales, como la propagación de la despolarización, la inflamación post-isquémica y la muerte celular. Por lo tanto, es evidente que el principal objetivo de la neuroprotección por parte de las variantes de rhEPO debe estar enfocado a proteger a la penumbra isquémica (Dirnagl y col., 1999). Estudios en animales indican que si el flujo no se restaura y el tejido no es protegido metabólicamente en un período de 4 a 6 horas, la región de penumbra se deteriora y constituye el agrandamiento del core isquémico, determinando este tiempo la ventana terapéutica ([Ginsberg, 1997](#)).

Sin embargo, la ventana de citoprotección puede probablemente ser más amplia, entre 8 y 12 h, antes que la lesión se complete y se vuelva irrecuperable ([Sosa y col., 2008](#)).

Por tal motivo, en el modelo desarrollado en este trabajo de tesis se evaluó el efecto de la administración intraperitoneal de las distintas variantes de rhEPO o su vehículo a los 15 min posteriores a la oclusión, seguido de una dosis diaria durante 4 días subsiguientes. Este mismo esquema terapéutico también fue aplicado a los animales control, que sólo fueron sometidos a la trepanación del cráneo con el objeto de evaluar si estas moléculas *per se* tenían algún efecto sobre el tejido cerebral. Este tiempo se consideró apropiado, por un lado, porque como se demostró en esta tesis, la rhNEPO y la rhEPO ingresan al LCR tras la administración intraperitoneal y alcanzan su máxima concentración luego de 4 y 8 horas post-administración, respectivamente (Apartado Resultados 7.1.1), estando estos tiempos comprendidos dentro de la ventana de citoprotección. Por otro lado, esta elección está respaldada por evidencias previas que reportan el efecto protector de la rhEPO tras ser administrada hasta 6 horas posteriores a la isquemia cerebral ([Brines y col., 2000](#)). La dosis empleada fue de $39,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($5.000 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$), que fue seleccionada según datos previos reportados en ratones inyectados por vía intraperitoneal ([Li y col., 2007b](#)). Sin embargo, en el mencionado trabajo los animales recibieron la primera dosis de rhEPO 30 min antes de la MCAO y luego durante dos días consecutivos, evaluando el daño tisular 3 días post-isquemia.

33.1 Efecto de la MCAO y de los diferentes tratamientos sobre la ingesta de comida y el peso de los animales.

Con el objeto de analizar si la intervención realizada y el tratamiento con las diferentes drogas afectaban el apetito de los animales se documentó la progresión del peso corporal y el consumo de alimento (granos de alimento balanceado de roedores por día). En todos los grupos experimentales se observó una disminución de la ingesta y, por consiguiente, del peso corporal un día después del procedimiento quirúrgico (D2), sin observarse diferencias significativas entre los grupos Control y los grupos MCAO (isquémicos), ni entre los grupos tratados con las diferentes drogas (Fig. 54). En los días siguientes, los animales comenzaron a recuperar peso y, ni la ingesta de alimentos, ni el peso corporal mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos (Fig. 54 A y B, respectivamente).

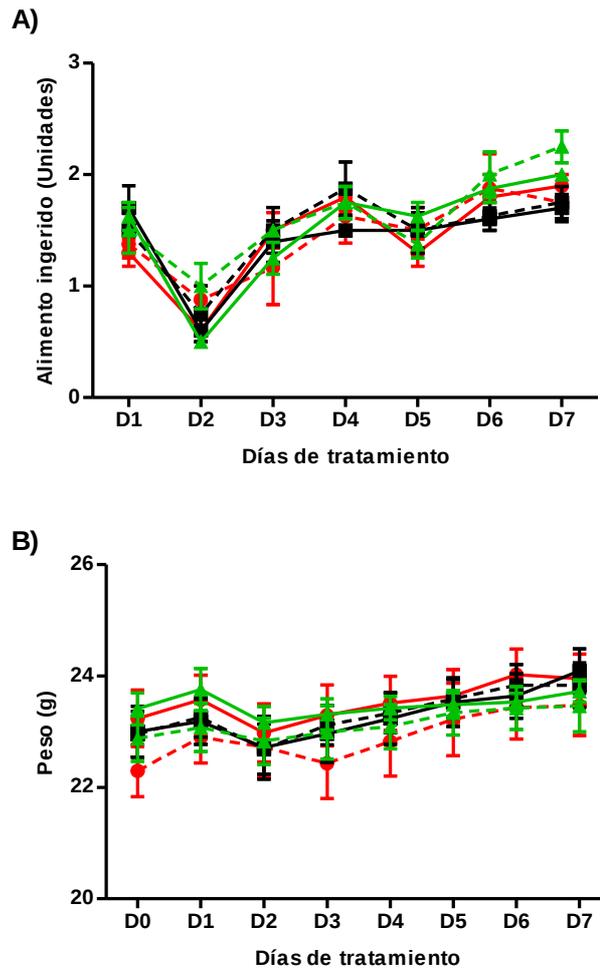


Fig. 54. Variación de la ingesta de alimentos (A) y del peso corporal (B) de los animales isquémicos (línea completa) y de los animales controles (línea punteada) durante el tratamiento.

Se graficó las unidades de alimento balanceado ingerido por animal por día (A) y el peso corporal, para cada grupo experimental según recibieron rhEPO (●), rhNEPO (■) o Vehículo (▲) en función del tiempo transcurrido de tratamiento. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=5).

33.2 Efecto de la MCAO y de los diferentes tratamientos sobre la actividad motora de los animales de experimentación.

Como se comentó anteriormente, la oclusión de la arteria cerebral media es uno de los modelos más utilizados para estudiar las enfermedades isquémicas. Sin embargo, un aspecto crítico es la evaluación del pronóstico neurológico final así como el efecto sobre la actividad sensoriomotora y cognitiva de los animales. En el modelo desarrollado en esta tesis la oclusión de la arteria cerebral media se realiza en forma distal por electrocoagulación afectando fundamentalmente la corteza motora y sensitiva primaria lo que altera, por consiguiente, la actividad sensoriomotora. Como se trata de un modelo unilateral, el daño en la actividad motora se vería reflejado en la

extremidad contralateral al lado dañado (izquierda). Con la finalidad de evaluar cómo afectaba dicha isquemia y el efecto de las variantes de rhEPO sobre el comportamiento de los animales, se seleccionaron diversas pruebas conductuales que han sido reportadas en la bibliografía para poner en evidencia los daños ocasionados por esta lesión.

En primer lugar, con el objeto de evaluar el estado neurológico global luego de la oclusión dicha arteria, se aplicó la escala neurológica de 5 puntos descrita por [Hatcher y col. \(2002\)](#). Las evaluaciones fueron realizadas a partir del D1, 3 horas después de la MCAO, luego día a día hasta el D7. La evolución neurológica de los animales se presenta en la Fig. 55. Los resultados obtenidos para cada grupo experimental se expresaron como el promedio \pm SEM y se resumen en la Tabla 10. De esta manera, se observa que el D1, en todos los casos, se produjo un incremento en la escala neurológica con respecto al grupo Control-Vehículo, que fue sólo estadísticamente significativo con el grupo MCAO-Vehículo.

En cuanto a los grupos MCAO que fueron tratados con rhEPO o rhNEPO, mostraron un aumento del IDN estadísticamente significativo con respecto al grupo Control-Vehículo el D2 del tratamiento, que se fue atenuando con el tiempo y, ya a partir del D3, no mostró diferencias significativas con los grupos controles. Por otra parte, el IDN del grupo MCAO-Vehículo se mantuvo elevado y prácticamente constante durante todo el transcurso del experimento.

Al evaluar el efecto sobre el IDN al final del tratamiento (D7) se puede observar que los animales MCAO que recibieron rhEPO o rhNEPO ($0,40 \pm 0,52$ y $0,35 \pm 0,47$, respectivamente) no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo Control-Vehículo ($0,00 \pm 0,00$). Sin embargo, no ocurrió lo mismo con los animales MCAO tratados sólo con Vehículo ($1,77 \pm 0,44$) (Fig. 55 y Tabla 10).

Estos resultados pusieron en evidencia que el tratamiento con estas variantes de rhEPO permitió una recuperación del daño neurológico ocasionado por la oclusión de la arteria cerebral media en estos animales al final de la experiencia.

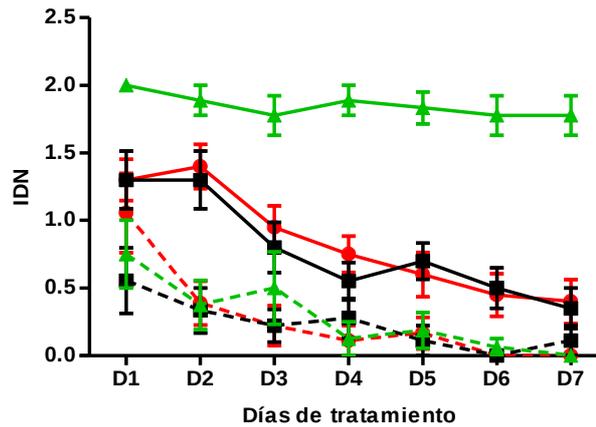


Fig. 55. Progresión del IDN en los animales isquémicos (línea completa) y en los animales controles (línea punteada) durante el tratamiento.

Se graficó el valor de la escala neurológica para cada grupo experimental según recibieron rhEPO (●), rhNEPO (■) o vehículo (▲) en función del tiempo transcurrido de tratamiento. Los resultados se muestran como el promedio ± SEM (n=10).

Tabla 10. IDN de los distintos grupos experimentales

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Control-Ve hículo	0,75±0,70	0,38±0,52	0,50±0,76	0,13±0,35	0,19±0,37	0,06±0,18	0,00±0,00
Control-rh EPO	1,06±0,88 ^{ns}	0,38±0,49 ^{ns}	0,22±0,44 ^{ns}	0,11±0,33 ^{ns}	0,17±0,35 ^{ns}	0,00±0,00 ^{ns}	0,00±0,00 ^{ns}
Control-rh NEPO	0,56±0,73 ^{ns}	0,33±0,50 ^{ns}	0,22±0,36 ^{ns}	0,28±0,44 ^{ns}	0,11±0,33 ^{ns}	0,00±0,00 ^{ns}	0,11±0,33 ^{ns}
MCAO-Ve hículo	2,00±0,00 ^{**} *	1,88±0,33 ^{**} *	1,77±0,44 ^{***}	1,89±0,33 ^{**} *	1,83±0,35 ^{**} *	1,78±0,44 ^{**} *	1,77±0,44 ^{***}
MCAO-rhE PO	1,33±0,48 ^{ns}	1,40±0,52 ^{**} *	0,95±0,50 ^{ns}	0,75±0,42 [*]	0,60±0,52 ^{ns}	0,45±0,50 ^{ns}	0,40±0,52 ^{ns}
MCAO-rhN EPO	1,30±0,67 ^{ns}	1,30±0,67 ^{**} *	0,80±0,59 ^{ns}	0,55±0,44 ^{ns}	0,70±0,42 ^{ns}	0,50±0,47 ^{ns}	0,35±0,47 ^{ns}

Los valores se expresan como el promedio ± SD (n=10). La diferencia significativa entre los tratamientos fue calculada aplicando el test de ANOVA seguido por el test de Bonferroni. Se comparan los resultados con el grupo Control-Vehículo, indicando ns: no significativo, * p≤0,05 y *** p≤0,001.

Cuando se evaluó el efecto del daño isquémico y de los tratamientos sobre la conducta de los distintos grupos experimentales, los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que ninguna de la pruebas fue capaz de poner en evidencia diferencias significativas entre los grupos Control-Vehículo y MCAO-Vehículo.

En la Fig. 56 se observa que los resultados obtenidos durante la prueba de fuerza de las extremidades delanteras son prácticamente idénticos entre todos los grupos experimentales. El último día del experimento mostró, en todos los casos, una disminución del tiempo de permanencia en la cuerda sin evidenciarse diferencias entre ellos. Estos resultados son consistentes con los observados por otros autores cuando emplearon esta prueba tras efectuar un modelo de isquemia cerebral focal utilizando la técnica del monofilamento en ratones C75Bl/6 ([Hattori y col., 2000](#); [Li y col., 2004](#)). Por lo tanto, la mencionada prueba no resultaría útil para evaluar este tipo de lesión ya que observó su ineficacia en dos cepas de ratones y en modelos de MCAO diferentes.

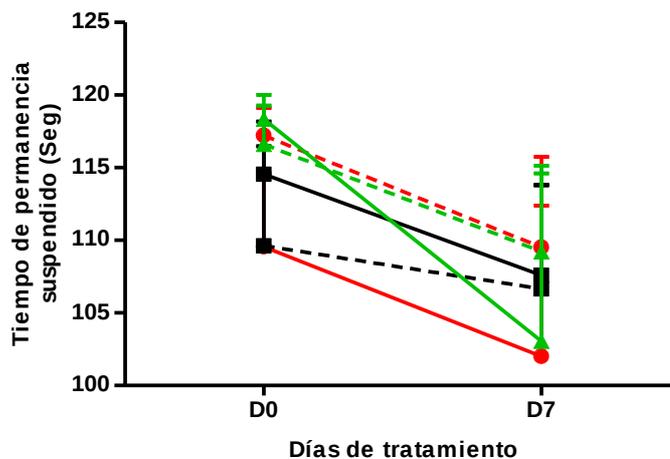


Fig. 56. Evaluación de la fuerza de las extremidades delanteras en los animales isquémicos (línea completa) y en los animales controles (línea punteada) durante el tratamiento.

Se graficó el tiempo que el animal permaneció suspendido en la cuerda para cada grupo experimental según recibieron rhEPO (●), rhNEPO (■) o Vehículo (▲) en función del tiempo transcurrido de tratamiento. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=10).

Por otra parte, cuando se llevó a cabo la prueba del cilindro tampoco se pudo discriminar entre el grupo Control y el isquémico tratado sólo con Vehículo. En la Fig. 57A se observa el porcentaje de uso de las extremidades delanteras (derecha, izquierda o ambas), el cual resultó prácticamente idéntico para cada grupo experimental (30-40%), conservando el mismo valor luego de los 7 días de tratamiento.

Por otro lado, con el objetivo de normalizar los datos, se expresó el uso relativo de la extremidad derecha realizando el cociente entre el porcentaje de uso correspondiente a los días 7 y 0 (D7/D0) (Fig. 57B) considerando, que como la MCAO fue realizada del lado derecho, la extremidad delantera afectada sería la izquierda debido a que la lesión afecta las vías motoras cruzadas y, en consecuencia, los

animales con mayor daño isquémico presentarían un uso incrementado de la extremidad derecha. Si bien en este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, es importante destacar que los animales MCAO tratados con rhNEPO presentaron un menor uso de la extremidad derecha que a pesar de que no llegó a ser significativo resulta muy alentador.

La utilidad de esta prueba resulta contradictoria, ya que si bien algunos autores han reportado con éxito su uso en modelos de MCAO desarrollados en ratas (Schallert y col., 2000) y ratones (Li y col., 2004), también existen otras evidencias de su ineficacia para su aplicación en dichos modelos (Freret y col., 2009; McGill y col., 2005), tal como se ha reportado en este trabajo de tesis.

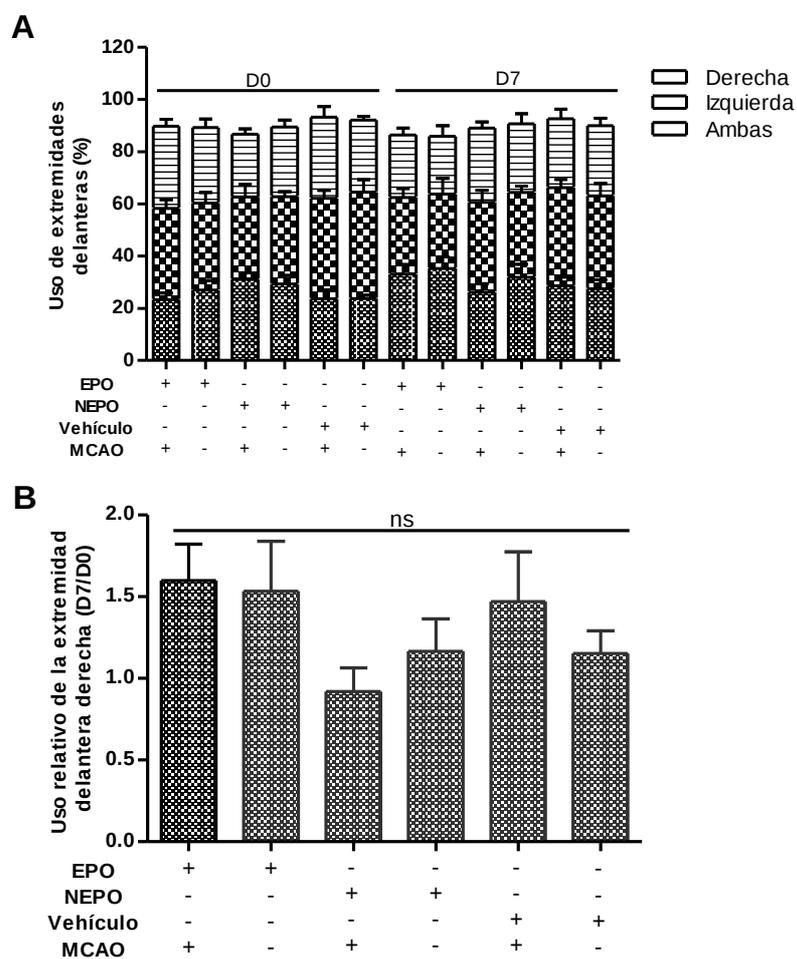


Fig. 57. Evaluación del uso de las extremidades delanteras durante la exploración vertical.

- A. Porcentaje de uso de las extremidades delanteras (derecha, izquierda o ambas).
- B. Uso relativo de la extremidad delantera derecha luego del D7 del tratamiento con respecto al D0. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=10). ns: sin diferencias significativas según test ANOVA seguido de test de Newman-Keuls.

Finalmente, al evaluar la prueba de la esquina, los resultados obtenidos se normalizaron y se presentan en la Fig. 58.

Esta prueba tampoco fue capaz de diferenciar entre el grupo Control-Vehículo y el grupo MCAO-Vehículo. Esta ausencia de diferencia entre los grupos ya había sido reportada por otros autores, quienes emplearon el mismo modelo de MCAO distal por electrocoagulación con la cepa de ratones Swiss. Por lo tanto, si bien existen trabajos que reportan su utilidad ([Li y col., 2004](#); [Zhang y col., 2002](#)), en esta ocasión esta prueba tampoco fue apropiada.

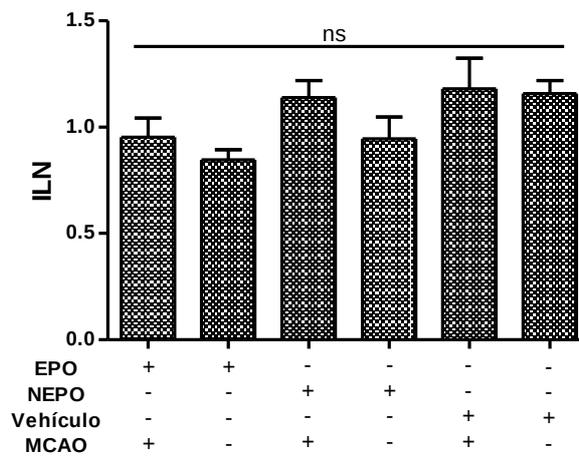


Fig. 58. Evaluación del índice de lateralidad normalizado (ILN) en los animales isquémicos y los animales control durante el tratamiento.

Se graficó el ILN al D7 de tratamiento para cada grupo experimental según recibieron rhEPO, rhNEPO o Vehículo. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM ($n=10$). ns: sin diferencias significativas según test ANOVA seguido de test de Newman-Keuls.

Resumiendo, de toda la batería de pruebas planteadas para analizar la funcionalidad neurológica quedó demostrado que su evaluación sólo fue posible mediante la aplicación de la escala neurológica propuesta por [Hatcher y col. \(2002\)](#). La mencionada metodología fue la única que permitió evidenciar diferencias significativas entre el grupo Control y MCAO tratados sólo con Vehículo y, al mismo tiempo, puso en evidencia la acción de la rhEPO y rhNEPO para preservar el estado neurológico de los animales sometidos a un daño isquémico.

Contrariamente, el resto de las pruebas no permitieron observar ninguna diferencia entre los grupos experimentales, por lo que no se pudo evaluar el efecto de las variantes de rhEPO.

Por lo tanto, de la gran variedad de pruebas que evalúan la actividad sensoriomotora, las seleccionadas para este trabajo de tesis no fueron las apropiadas para estudiar el efecto de la oclusión de la arteria cerebral media sobre dicha actividad empleando la cepa de ratones Balb/c (a pesar de haber sido reportada su aplicación en otros modelos de MCAO y cepas de roedores). No obstante, es importante destacar que la mayoría de las pruebas fueron inicialmente empleadas para evaluar el daño sensoriomotor en ratas y luego fueron adaptadas a ratones, siendo aplicadas fundamentalmente a la cepa C57Bl/6. Este dato es importante ya que ha sido reportada una gran variabilidad intra e inter especie en relación al tamaño de la lesión luego de la MCAO en ratones, lo cual ocasiona consecuencias neurológicas diferentes ([Barone y col., 1993](#); [Cheng y col., 2012](#); [Majid y col., 2000](#)). Además, se evidenció una gran diferencia en el grado de recuperación espontánea entre los ratones y ratas, siendo mejor en ratones que en roedores de mayor tamaño, complicando la evaluación de las pruebas sensoriomotoras ([Li y col., 2004](#)). Por consiguiente, se podría concluir que existe la necesidad de hallar las pruebas más apropiadas para evaluar dicha actividad según el modelo animal empleado, que permitan demostrar el daño neuronal efectuado.

33.3 Evaluación del daño tisular y efecto de las variantes de rhEPO sobre el volumen de infarto.

El volumen del tejido infartado es un indicador del daño neuronal ocasionado y está focalizado al área del core isquémico. Si las terapias neuroprotectoras empleadas presentan un efecto citoprotector, este volumen debería disminuir ya que se preserva el tejido, debido a que las células que se encuentran en la penumbra isquémica no evolucionan a la muerte celular.

En la Fig. 59 se observa que todos los animales pertenecientes a los grupos controles no presentaron áreas infartadas mientras que los animales sometidos a la MCAO mostraron una disminución de la masa cerebral, siendo las principales zonas afectadas la corteza, la subcorteza y en algunos casos el estriado, dependiendo de la intensidad de la lesión.

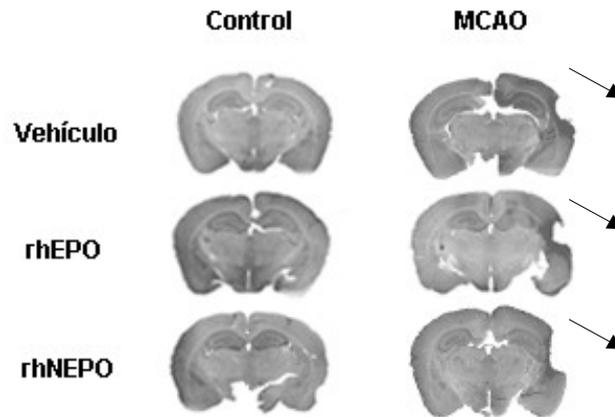


Fig. 59. Secciones representativas del área de la corteza e hipocampo de los distintos animales evaluados.

Las flechas indican el área infartada en la zona de la corteza.

Al cuantificar el área de las distintas secciones de cada animal e integrarlas, se obtuvo el volumen de infarto, expresado en mm^3 . En la Fig. 60 se observa que para el caso del grupo MCAO, que recibió sólo Vehículo, el volumen infartado fue relativamente bajo siendo inferior a $2,5 \pm 1,9 \text{ mm}^3$. Por otro lado, la rhEPO y la rhNEPO mostraron una disminución del mismo ($1,45 \pm 1,30 \text{ mm}^3$ y $1,62 \pm 1,08 \text{ mm}^3$, respectivamente), resultando en una reducción del 35 al 42 % del volumen de infarto con respecto al Vehículo. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa. [Bernaudin y col. \(1999\)](#) obtuvieron resultados similares cuando emplearon un modelo de isquemia cerebral focal, observando una reducción del 47% del volumen de infarto cuando los animales recibieron 24 h antes de la injuria una dosis de rhEPO ($0,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$) por vía intracerebrovascular, mientras que el efecto no fue observado cuando la hormona fue administrada en forma concomitante con la oclusión.

Otra posible explicación de la ausencia de diferencias significativas podría fundamentarse teniendo en cuenta lo reportado por [Grasso y col. \(2004\)](#), quienes establecen que la rhEPO es menos efectiva en modelos de isquemia permanente con respecto a aquellos donde existe restauración del flujo sanguíneo, dado que el área de penumbra para que la rhEPO cumpla su rol citoprotector podría ser menor.

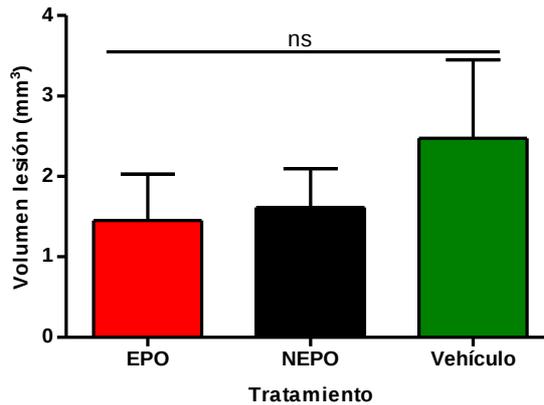


Fig. 60. Volumen de infarto calculado para cada grupo experimental.

Se graficó el volumen de infarto calculado para cada animal luego de 7 días de oclusión de la arteria cerebral media, según recibieron rhEPO, rhNEPO o Vehículo. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=5). ns: sin diferencias significativas según test ANOVA seguido de test de Newman-Keuls

33.4 Efecto de la MCAO y los tratamientos sobre los procesos dendríticos

En el cerebro adulto ocurren permanentemente cambios adaptativos en la estructura y la función de las neuronas. Estos cambios, que corresponden a la denominada plasticidad cerebral, están implicados en procesos como el aprendizaje y la memoria y, además, desempeñan un importante papel en la recuperación del sistema nervioso ante diferentes tipos de lesión ([Kolb y col., 2003](#); [Tokuda y Hatase, 1998](#)). El citoesqueleto de la neurona es uno de los principales elementos relacionados con su morfología y su plasticidad. Está constituido por microfilamentos (7 nm), filamentos intermedios (10 nm) y microtúbulos (24 nm). Estas estructuras son fundamentales tanto en la morfogénesis como en el mantenimiento de la estructura de la neurona y cumplen, además, funciones de transporte de macromoléculas y orgánulos a través del soma y las prolongaciones neuronales.

Los microtúbulos están constituidos por unidades de α y β tubulina ensambladas de forma intercalada, de tal manera que forman largos y flexibles cilindros de 24 nm de diámetro que tienen su origen en el centro de organización microtubular (COM) cerca del núcleo neuronal y se dirigen a la periferia del soma o a las dendritas. Una gran cantidad de proteínas de la familia MAP2 y Tau, denominadas proteínas asociadas a microtúbulos 2 (MAP2) son, en gran parte, responsables de la polimerización, estabilidad y organización de las unidades de tubulina α y β que constituyen los microtúbulos ([Mandelkow y col., 1995](#); [Wiche y col., 1991](#)). Los cambios en el ensamblaje de los microtúbulos y en la inmunorreactividad de las MAP2 y Tau se han

convertido en un importante y sensible indicador de respuesta neuronal al daño isquémico ([Arango-Davila y col., 2004](#)). Esta sensibilidad se origina principalmente por los cambios dendríticos, por lo que constituye un método de abordaje de la plasticidad cerebral desde el punto de vista estructural ([Arango-Davila y col., 2004](#); [Li y col., 2000](#)).

En este trabajo, se evaluó el área que presentó inmunomarcación para la proteína MAP2 en dos regiones: la corteza (Cx) motora (M1/M2) y el CA1 del hipocampo, no sólo porque estas áreas son sensibles a la hipoxia inducida por la MCAO sino también porque se ha demostrado la expresión del ARNm EPOR y de la proteína funcional en las neuronas presentes en dichas regiones ([Bernaudin y col., 1999](#); [Morishita y col., 1997](#)).

En ambas zonas, su inmunomarcación mostró un perfil filamentososo o fibroso orientado predominantemente según la orientación de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de ambas áreas. La superficie cubierta por fibras se expresó en relación al grupo Control-Vehículo, por lo cual los resultados se graficaron como área relativa (%).

En la Fig. 61B se observa que en la corteza cerebral no hubo diferencias significativas en el área cubierta por fibras entre los diferentes tratamientos aplicados (Control-Vehículo: 100 ± 4 , Control-rhEPO: 112 ± 13 , Control-rhNEPO: 96 ± 6 , MCAO-Vehículo: 98 ± 6 , MCAO-rhEPO: 96 ± 5 y MCAO-rhNEPO: 112 ± 4). Por lo tanto, se podría inferir que la injuria isquémica ocasionada por la oclusión de la arteria cerebral media en estos animales no afectó la arborización dendrítica en el área de la corteza analizada. Asimismo, las variantes de rhEPO tampoco evidenciaron ningún tipo de efecto en esta región.

Cuando se analizó lo ocurrido en el área del CA1 del hipocampo (Fig. 62), no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo MCAO que recibieron rhEPO (148 ± 11 vs. 151 ± 12), rhNEPO (136 ± 12 vs. 124 ± 8) o Vehículo (100 ± 7 vs. 87 ± 8). Sin embargo, se observó una disminución del área relativa cubierta por fibras MAP2 en el grupo MCAO-Vehículo, la cual no llegó a ser estadísticamente significativa. No obstante, los tratamientos con las variantes de rhEPO incrementaron en forma significativa la arborización dendrítica con respecto al Vehículo, tanto en el grupo control como MCAO, no observándose diferencias significativas entre el efecto de ambas moléculas.

Este efecto promotor del crecimiento axonal y dendrítico ha sido recientemente reportado por otros autores en cultivos de neuronas hipocampales ya sea polarizadas o en condiciones basales ([Oh y col., 2012](#); [Ransome y Turnley, 2008](#)). En particular, estudios recientes demostraron que la rhEPO estimula diferencialmente la extensión

de las neuritas en neuronas del hipocampo polarizadas en función al tiempo de administración con respecto al estado de polarización neuronal. Además, proporcionó evidencias de que la rhEPO podría promover el crecimiento axonal y la ramificación a través de la activación de la vía PI-3 kinasa/Akt en dichas neuronas ([Ransome y Turnley, 2008](#)).

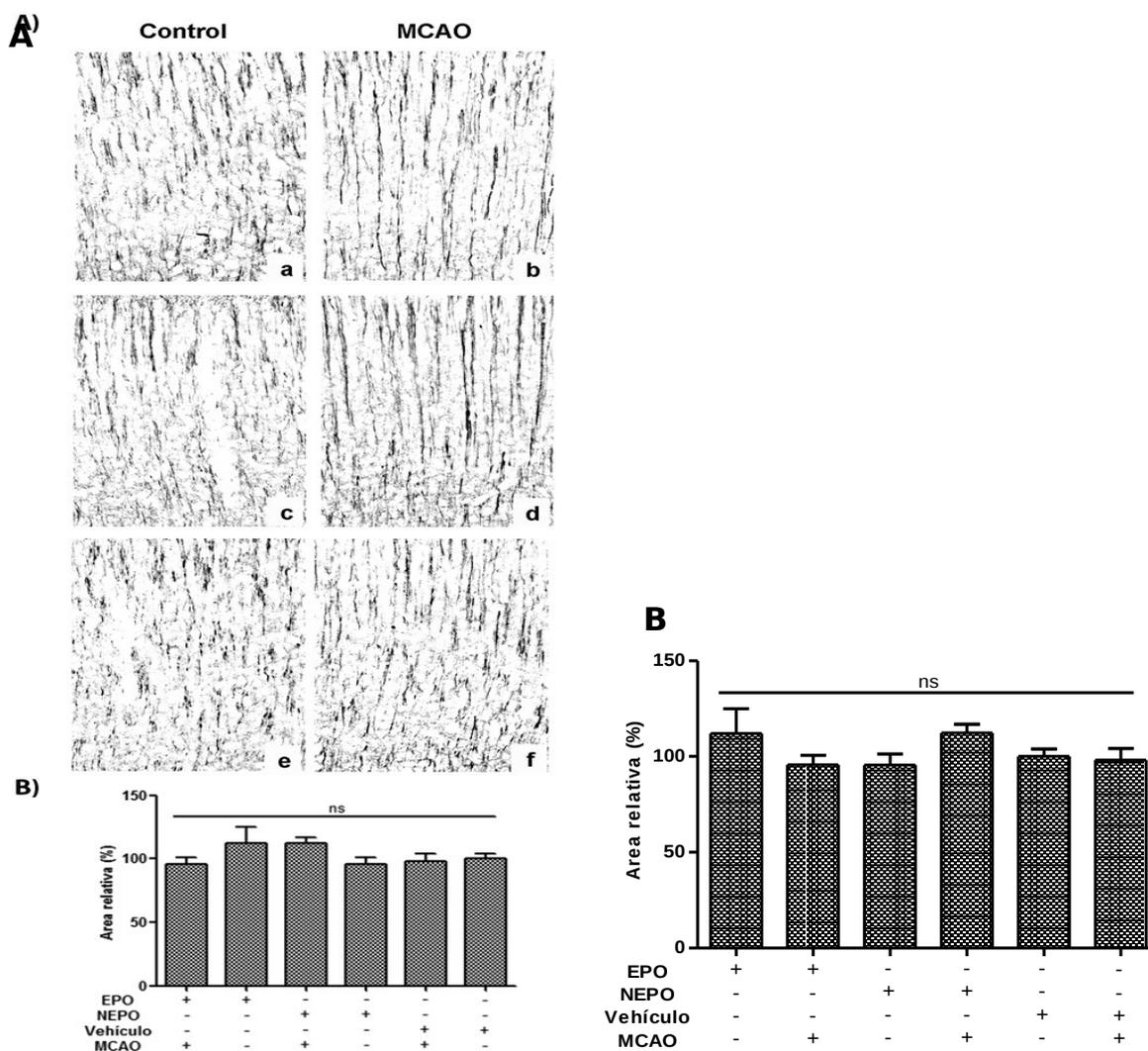


Fig. 61. Área relativa (%) cubierta por fibras MAP2 en la Cx.

- A.** Inmunohistoquímica de MAP2 en Cx de los grupos control y MCAO según recibieron rhEPO (a y b), rhNEPO (c y d) o Vehículo (e y f).
- B.** Se presenta el área relativa porcentual respecto del grupo Control-Vehículo de los distintos grupos experimentales. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=5). ns: sin diferencias significativas según test ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

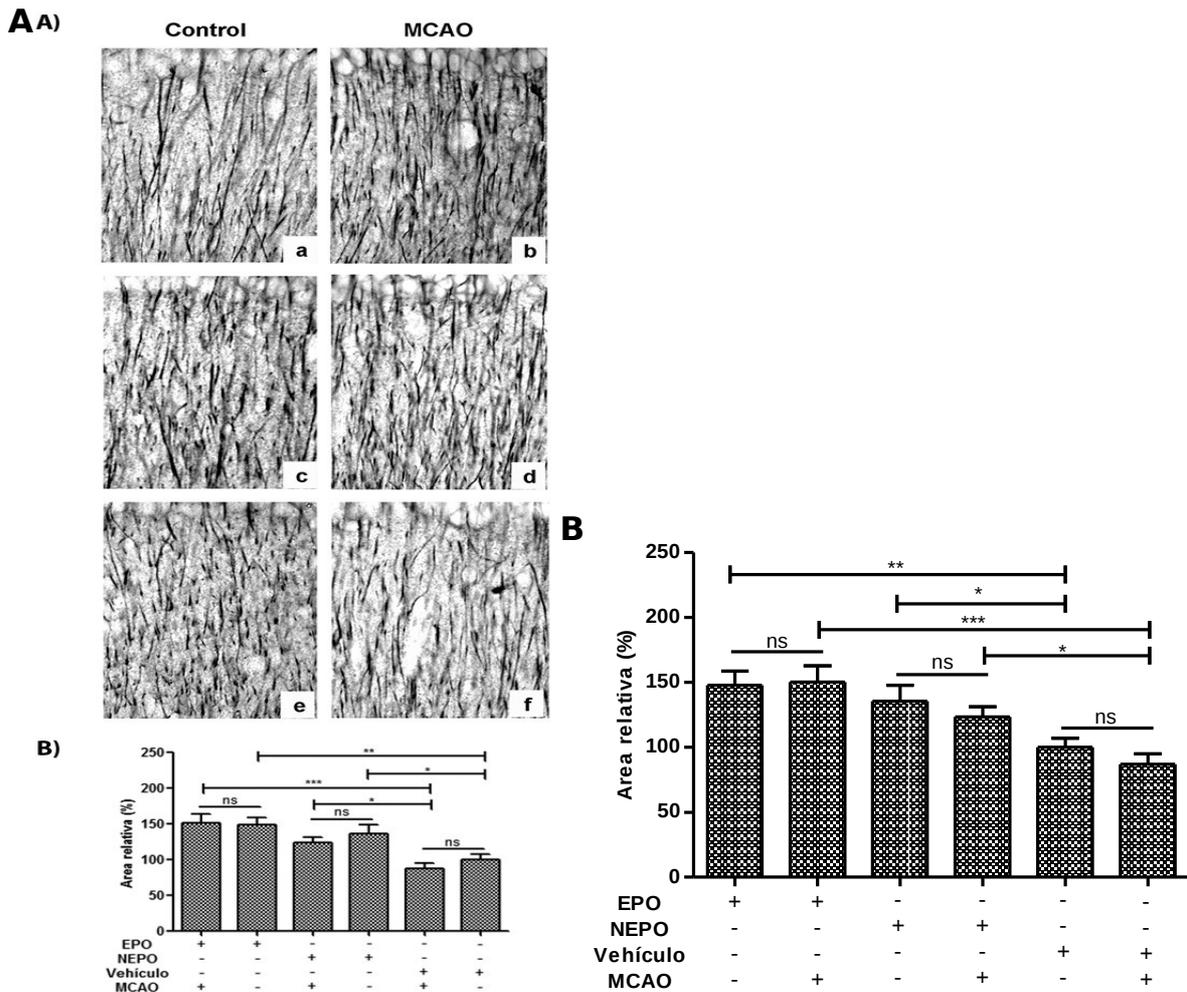


Fig. 62. Área relativa (%) cubierta por fibras MAP2 en la zona CA1 del hipocampo.

- A.** Inmunohistoquímica de MAP2 en CA1 del hipocampo de los grupos control y MCAO según recibieron rhEPO (a y b), rhNEPO (c y d) o Vehículo (e y f).
- B.** Se presenta el área relativa porcentual respecto del grupo Control-Vehículo de los distintos grupos experimentales. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=5). ns: sin diferencias significativas, * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$ según Test ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

33.5 Efecto de la MCAO y los tratamientos sobre los neurofilamentos

Los neurofilamentos son los filamentos intermedios más abundantes de las neuronas. Están constituidos por tres subunidades, formando lo que se conoce como el triplete de proteínas de neurofilamentos, que consisten en neurofilamentos de baja masa molecular (≈ 70 k), media masa molecular ($\approx 140-160$ kDa) y alta masa molecular (≈ 200 kDa). Juegan un rol crítico en la función neuronal no sólo como una proteína del citoesqueleto, manteniendo la forma y el calibre, sino también como un facilitador del transporte axonal, ya que el diámetro del axón es uno de los principales determinantes

de la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos a lo largo del mismo ([Aronowski y col., 1999](#); [Voyvodic, 1989](#)).

Interesantemente, las proteínas del neurofilamento son sustrato de la calpaína, proteasa dependiente de calcio/calmodulina ([Schlaepfer y col., 1985](#); [Schlaepfer y Zimmerman, 1985](#)) y, por lo tanto, la degradación del neurofilamento puede ocurrir cuando se pierde la homeostasis celular como consecuencia de una injuria cerebral. Por ejemplo, en condiciones de isquemia se ha observado una degradación de ciertas proteínas del neurofilamento, principalmente la proteína NF-200. Por ese motivo, el estudio su inmunorreactividad es un marcador del daño neuronal ocasionado por un insulto isquémico ([Camargo-De-Morais y col., 1996](#); [Hwang y col., 2005](#); [Stys y Jiang, 2002](#)).

Con la finalidad de evaluar el efecto de la MCAO, así como también de las variantes de rhEPO sobre los neurofilamentos, en el presente trabajo se utilizó al marcador NF-200, y el área cubierta por procesos NF-200 se expresó como área relativa, considerando como 100 % al grupo Control-Vehículo.

A los siete días post-isquemia no existieron diferencias significativas en el área relativa NF-200 positiva en la corteza entre ninguno de los grupos experimentales (Control-Vehículo: $100 \pm 8\%$, Control-rhEPO: $100 \pm 4\%$, Control-rhNEPO: $119 \pm 7\%$, MCAO-Vehículo: $92 \pm 6\%$, MCAO-rhEPO: $94 \pm 9\%$ y MCAO-rhNEPO: $90 \pm 6\%$; Fig. 63).

Por otra parte, al estudiar lo ocurrido en el área CA1 del hipocampo (Fig. 64), no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos control (Control-Vehículo: $100 \pm 9\%$, Control-rhEPO: $115 \pm 6\%$ y Control-rhNEPO: $87 \pm 4\%$). Sin embargo, sí se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y MCAO que recibieron sólo la solución vehículo ($100 \pm 9\%$ y $63 \pm 7\%$, respectivamente), mientras que las variantes de rhEPO no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control pero sí con respecto al grupo MCAO-Vehículo.

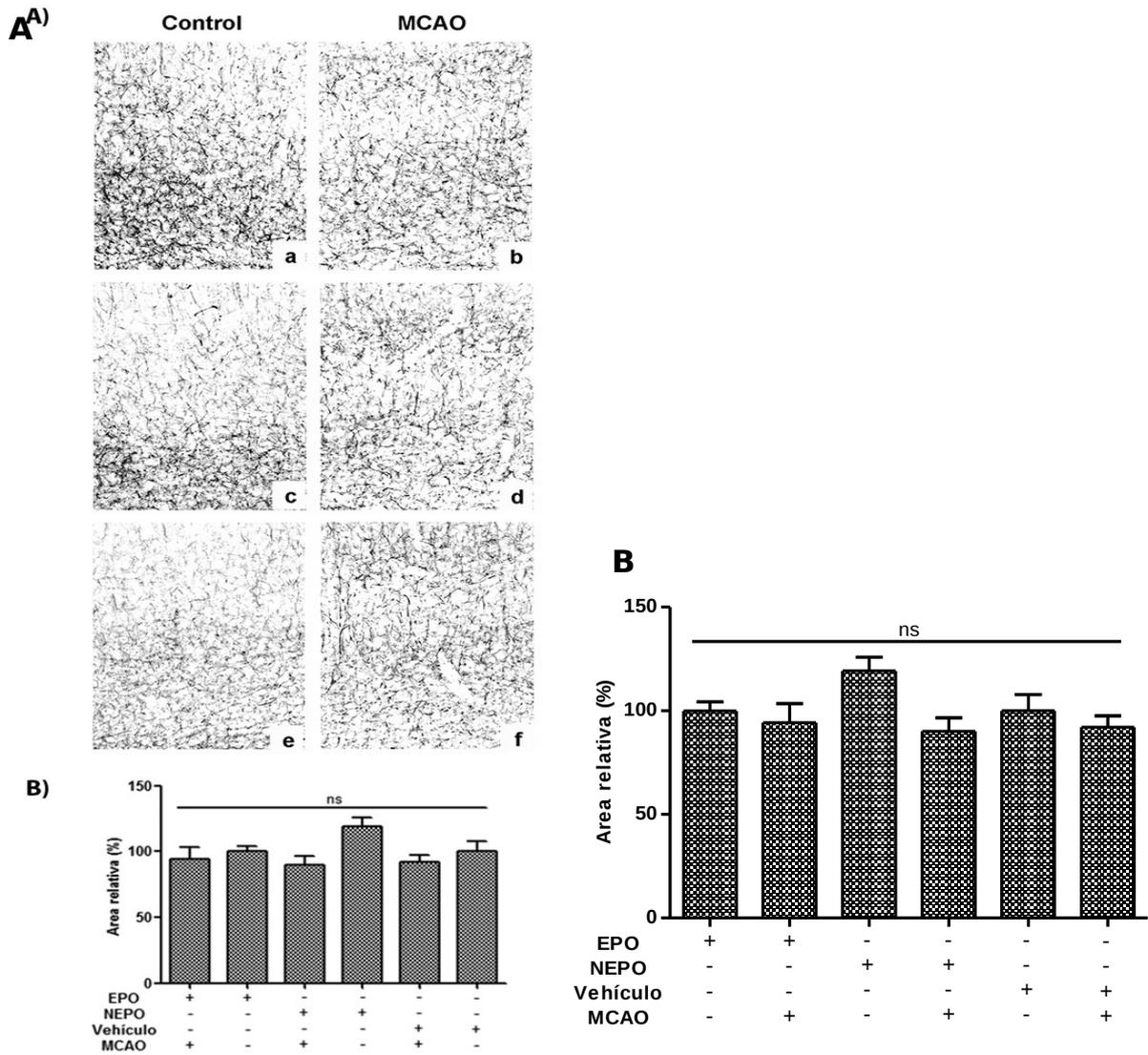


Fig. 63. Área relativa (%) cubierta por filamentos NF-200 en la corteza.

- A.** Inmunohistoquímica de NF-200 en la corteza de los grupos control y MCAO según recibieron rhEPO (a y b), rhNEPO (c y d) o Vehículo (e y f).
- B.** Se presenta el área relativa porcentual respecto del grupo Control-Vehículo de los distintos grupos experimentales. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=5). ns: sin diferencias significativas según test ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

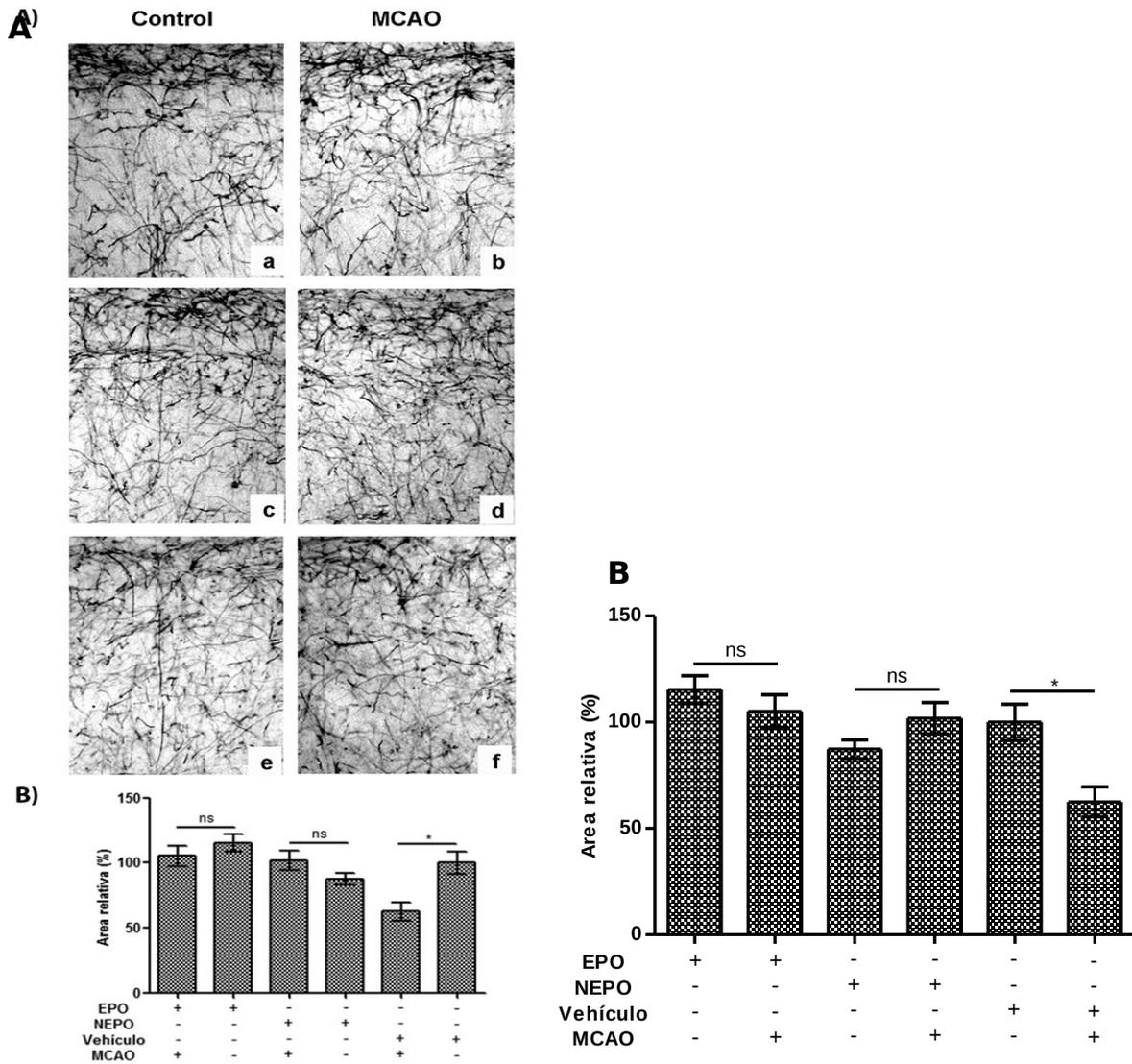


Fig. 64. Área relativa (%) cubierta por filamentos NF-200 en la región CA1 del hipocampo.

- A.** Inmunohistoquímica de NF-200 en la región CA1 del hipocampo de los grupos control y MCAO según recibieron rhEPO (a y b), rhNEPO (c y d) o Vehículo (e y f).
- B.** Se presenta el área relativa porcentual respecto del grupo Control-Vehículo de los distintos grupos experimentales. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM (n=5). ns: sin diferencias significativas y * $p \leq 0,01$ según test ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

Por lo tanto, se podría inferir que el tratamiento con las variantes de rhEPO preservó la citoarquitectura ya sea por un aumento del número de ramificaciones o por el incremento del diámetro axonal, que se puso en evidencia por la preservación del área cubierta por NF-200.

Este resultado, sumado al efecto estimulador de la oligodendrogénesis reportado para la rhEPO ([Zhang y col., 2010](#)), permiten suponer que esta hormona y, por consiguiente, la rhNEPO, facilitarían la remielización axonal, contribuyendo en la recuperación funcional luego de un accidente cerebro vascular isquémico.

33.6 Efecto de la MCAO y los tratamientos sobre la respuesta de la macroglia

Además de las neuronas, el sistema nervioso está conformado por otros tipos diferentes de células especializadas, que conforman la denominada neuroglia, y por muy escaso tejido conectivo. Dentro de la neuroglia se encuentran dos grupos celulares, la macroglia y la microglia. La macroglia está constituida por dos tipos de células, los oligodendrocitos y los astrocitos, siendo estos últimos las células más abundantes.

Los astrocitos son células complejas y altamente diferenciadas que tapizan el SNC en su totalidad de manera continua y realizan numerosas contribuciones esenciales para la función normal del SNC, que incluyen la regulación del flujo sanguíneo, la provisión de metabolitos energéticos para las neuronas, la participación en funciones sinápticas y de plasticidad y el mantenimiento del balance extracelular de iones, líquido y neurotransmisores ([Sofroniew, 2009](#)).

La forma de los astrocitos varía mucho según el lugar en el que se encuentren pero, básicamente, la mayoría son células de soma estrellado del que parten prolongaciones citoplasmáticas más o menos numerosas (más cortas, abundantes y ramificadas en los protoplasmáticos y más largas, rectas, escasas y menos ramificadas en los fibrosos). El soma en sí es escaso y tiene poco desarrollo de la mayoría de las organelas. El núcleo es generalmente oval, siempre de cromatina laxa y sin nucléolos visibles. Sólo los astrocitos maduros poseen en el citoesqueleto un tipo especial de filamentos intermedios, la denominada proteína gliofibrilar ácida (GFAP), más abundante en los astrocitos fibrosos que en los protoplasmáticos. Esta proteína es la principal determinante de la forma celular y de la forma y grado de extensión de las prolongaciones citoplasmáticas que los caracterizan ([Ham y Cormack, 1986](#); [Jones y Cowan, 1986](#)).

En la isquemia cerebral focal se observa activación de la macroglia, no sólo en el sector focal y en el área de penumbra, sino también en sectores alejados del foco isquémico ([Schiffer y col., 1986](#)). Esta activación, fundamentalmente de los astrocitos, denominada astrogliosis reactiva, se usa para indicar cambios estructurales y fisiológicos que sufren dichas células como respuesta a lesiones traumáticas, isquémicas o infecciosas en el sistema nervioso. Estos cambios pueden ser temporales o desencadenar reorganizaciones estructurales definitivas, en cuyo caso

se usa el término cicatriz glial. Sin embargo, la cicatriz glial no se forma exclusivamente a expensas de los astrocitos, sino que en su conformación participan otros tipos de células, como fibroblastos y células epiteliales ([Arango-Davila y col., 2004](#); [Ramírez-Expósito y Martínez-Martos, 1998](#)).

Los astrocitos reactivos se caracterizan morfológicamente por un aumento de tamaño (hipertrofia) y un incremento en el número y extensión de sus prolongaciones. Se pueden observar a partir de las primeras 6 h de la lesión isquémica y está asociado con un incremento de la GFAP, por lo cual el estudio de esta proteína se ha establecido como uno de los marcadores más sensibles para observar la reacción astrocitaria ([Hatten y col., 1991](#)).

Con la finalidad de evaluar la astrogliosis reactiva producida por la MCAO, en el presente trabajo se utilizó al marcador GFAP y el área cubierta por el soma y los procesos positivos para tal marcador. Asimismo, se evaluó el efecto de la rhEPO y rhNEPO sobre dicha respuesta.

Los resultados obtenidos se expresaron como área relativa cubierta por procesos GFAP positivos, considerando como 100% al grupo Control-Vehículo.

En la Fig. 65 se observa que la MCAO provocó un incremento de la astrogliosis reactiva en la corteza cerebral en todos los tratamientos aplicados con respecto a los correspondientes grupos controles, existiendo diferencias altamente significativas entre el grupo MCAO y el grupo Control que recibieron sólo vehículo, diferencias con un bajo grado de significancia entre el grupo MCAO y Control tratados con rhEPO y diferencias que no llegaron a ser estadísticamente significativas entre el grupo MCAO y Control que recibieron rhNEPO.

Por otra parte, en la región CA1 del hipocampo (Fig. 66) sólo se observó un incremento estadísticamente significativo de la reactividad de los astrocitos en el grupo MCAO-Vehículo con respecto al grupo Control-Vehículo ($147 \pm 10\%$ y $100 \pm 4\%$, respectivamente), por lo cual, se puede concluir que las variantes de rhEPO evaluadas mostraron una preservación de la respuesta astrogliosa en la región CA1 del hipocampo.

Como se expuso anteriormente, los astrocitos son importantes en el mantenimiento del correcto funcionamiento del SNC, y una de las tantas funciones relevantes de los mismos es proteger a las neuronas del estrés oxidativo neutralizando las especies reactivas de oxígeno ([Dringen y Hirrlinger, 2003](#); [Rabie y Marti, 2008](#)). Por lo tanto, la preservación de la respuesta astrogliosa por parte de las variantes de rhEPO estaría indicando la capacidad de ambas moléculas para disminuir la respuesta inflamatoria ocasionada por la MCAO. Este fenómeno antiinflamatorio ha sido ampliamente demostrado para la rhEPO en diversos modelos de isquemia cerebral, en los que la administración de dicha hormona en forma exógena redujo notablemente la

migración de las células inflamatorias al tejido isquémico, atenuando la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 y 6 y, por consiguiente, limitando el tamaño de la lesión ([Alnaeeli y col., 2012](#); [Sifringer y col., 2012](#); [Sosa y col., 2008](#); [Villa y col., 2003](#)).

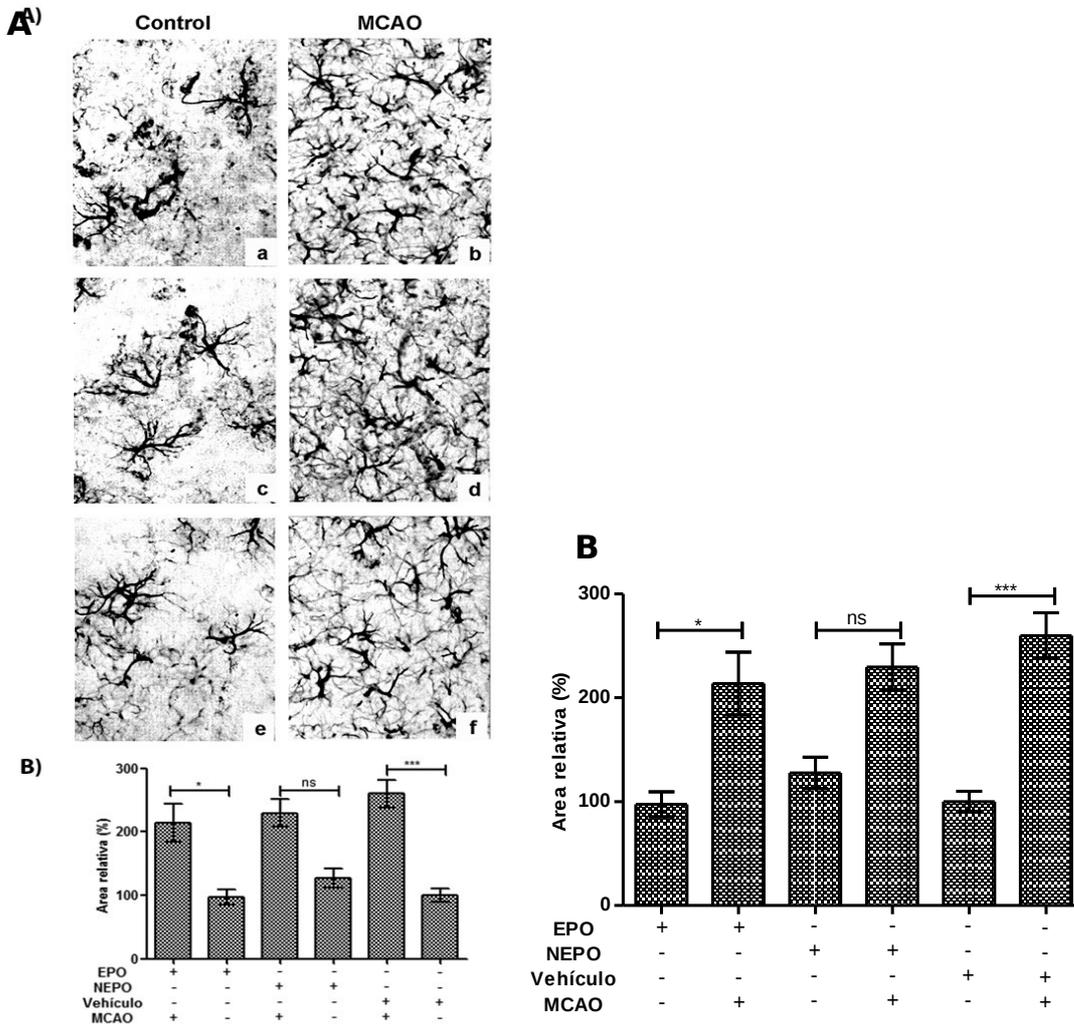


Fig. 65. Área relativa cubierta por astrocitos que muestra reactividad frente a la proteína GFAP en CX.

- A.** Inmunohistoquímica de GFAP en la corteza de los grupos control y MCAO según recibieron rhEPO (a y b), rhNEPO (c y d) o Vehículo (e y f).
- B.** Área relativa porcentual respecto al grupo Control-Vehículo de los distintos grupos experimentales. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. Grado de significancia estadística: * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$ ns: sin diferencias significativas, según test ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

Asimismo, la acción antiinflamatoria de la rhEPO ha sido observada en otros modelos de injuria cerebral tales como esclerosis múltiple y malaria cerebral ([Agnello y](#)

col., 2002; Sargin y col., 2010; Savino y col., 2006; Yuan y col., 2008; Zhang y col., 2005).

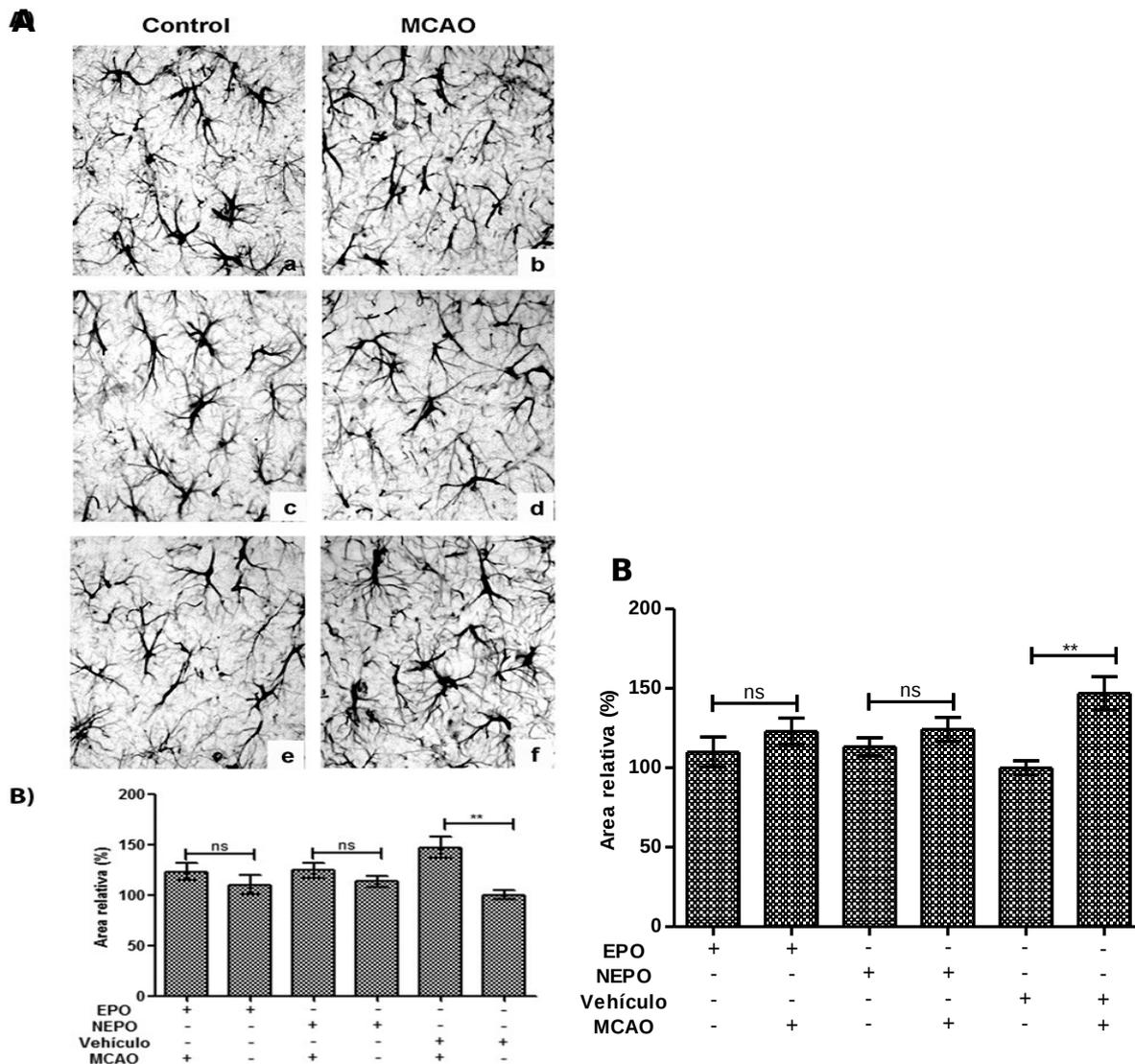


Fig. 66. Área relativa cubierta por astrocitos que demuestran reactividad frente a la proteína GFAP en la región CA1.

A. Inmunohistoquímica de GFAP en la región CA1 del hipocampo de los grupos control y MCAO según recibieron rhEPO (a y b), rhNEPO (c y d) o Vehículo (e y f).

B. área relativa porcentual respecto al grupo Control-Vehículo de los distintos grupos experimentales. Los resultados se muestran como el promedio ± SEM. ns: sin diferencias significativas y ** p ≤ 0,05, según test ANOVA seguido del test de Newman-Keuls.

34. Evaluación de la incidencia de las dosis diarias aplicadas a los animales sobre el hematocrito.

La evaluación de la variación en el hematocrito de los animales sometidos a altas dosis de rhEPO y rhNEPO durante el tratamiento aplicado en el modelo de isquemia cerebral focal es de gran relevancia, ya que se han observado efectos colaterales al empleo de la rhEPO con fines neuroprotectores asociados a su rol hematopoyético. Una de las principales complicaciones descritas, como se comentó anteriormente, es el incremento de la presión arterial y la aparición de efectos trombóticos, los cuales a su vez pueden comprometer la actividad neuroprotectora y endotelial de la rhEPO.

Por este motivo, el diseño de la nueva variante menos glicosilada (rhNEPO) tiene como fin evitar o disminuir tal efecto.

Para poder llevar a cabo este estudio, se emplearon 15 ratones Balb/c, divididos en 3 grupos (rhEPO, rhNEPO y vehículo) los cuales recibieron el mismo esquema de tratamiento que los animales empleados durante el desarrollo de la experiencia diseñada para evaluar el efecto de las variantes en un modelo de MCAO, pero en esta oportunidad no se les realizó ninguna cirugía.

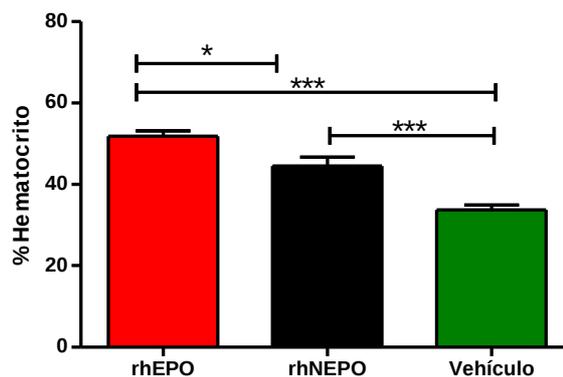


Fig. 67. Efecto de las variantes de rhEPO sobre el hematocrito de los animales de experimentación.

Se graficó el porcentaje del hematocrito calculado luego de 7 días de tratamiento según recibieron rhEPO, rhNEPO o vehículo. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. Grado de significancia estadística: * $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$ según test ANOVA seguido del test de Tukey ($n=5$).

Como se puede observar en la Fig. 67, la rhEPO incrementó el hematocrito alrededor del 50%, mientras que la rhNEPO sólo el 32% con respecto al grupo que sólo recibió el vehículo. Por lo tanto, esta nueva variante mostró una disminución del efecto hematopoyético indeseado del 20%.

Un dato interesante a tener en cuenta es el sitio de obtención de la muestra sanguínea y el tipo de anestesia empleado ya que ambas variables afectan los valores

de las células presentes en la sangre ([Nemzek y col., 2001](#)). Según bibliografía, ratones Balb/c anestesiados con la mezcla de ketamina/xilacina cuya muestra fue recolectada a partir de la vena retroorbital presentaron un hematocrito basal de $46,1 \pm 1,9\%$. En otro trabajo en el que se compararon los niveles sanguíneos normales en 18 cepas de ratones se informó un hematocrito promedio para la cepa Balb/c de $46,5 \pm 0,8\%$ ([Russell y col., 1951](#)). Por lo tanto, si se comparan estos valores con los valores obtenidos, se puede observar que no existen diferencias significativas con respecto a la rhNEPO pero sí para la rhEPO.

Asimismo, es importante tener en cuenta que la actividad biológica hematopoyética de la rhNEPO evaluada según la metodología vigente para la rhEPO como droga hematopoyética (Farmacopea Europea, Apartado 3.2) fue sólo de un 4% respecto de dicha hormona. Por lo tanto, el incremento del hematocrito evidenciado para la rhNEPO con respecto al Vehículo podría explicarse considerando que, en el experimento anteriormente descrito, las dosis administradas y la frecuencia de administración fueron muy superiores a las empleadas para la determinación de la actividad hematopoyética *in vivo* (método de referencia).

Por consiguiente, esta nueva variante de rhEPO se presenta como un buen candidato para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central ya que no sólo preservó la arquitectura neuronal sino que también disminuyó la astrogliosis reactiva de igual modo que la rhEPO, con un escaso efecto eritropoyético.

CONCLUSIONES

“Después de es
descubrimos que hay mucnas otras montanas por
escalar”.

Alfonso Martínez



CONCLUSI

En el tratamiento de enfermedades asociadas al sistema nervioso central es importante considerar que los agentes neuroprotectores no sólo sean capaces de disminuir los síntomas y desacelerar el progreso de la patología sino también que presenten la capacidad de detener su avance. Actualmente existen numerosos candidatos neuroprotectores en estudio, dentro de los cuales se encuentran compuestos nuevos obtenidos mediante la tecnología del ADN recombinante y moléculas ya establecidas farmacéuticamente para otras aplicaciones. Un claro ejemplo de este último caso es la rhEPO, que en los últimos años ha cobrado un interés particular en el campo de la neuroprotección debido a la gran cantidad de evidencias acerca de su expresión así como de su receptor en otros tejidos no hematopoyéticos, especialmente en células y órganos del SNC. Sin embargo, su aplicación prolongada como una droga neuroprotectora podría causar serios efectos adversos asociados a la estimulación de la eritropoyesis, tales como elevación de la masa de glóbulos rojos, hipertensión arterial y fenómenos trombóticos. Esto plantea la necesidad del desarrollo de análogos que conserven tales propiedades neuroprotectoras pero presenten escasa actividad hematopoyética.

Por ese motivo, en el presente trabajo de tesis se propuso la obtención de una nueva combinación de isoformas de eritropoyetina humana recombinante con menor contenido de ácido siálico terminal, con el fin preservar sus características neuroprotectoras y, al mismo tiempo, disminuir o anular su capacidad eritropoyética. Esta estrategia se fundamenta sobre dos pilares. El primero está relacionado con la importancia del ácido siálico terminal sobre la vida media plasmática y su efecto sobre la actividad biológica de la hormona, ya que para que cumpla su rol hematopoyético es necesario que se encuentre en forma continua en sangre en concentraciones suficientes para unirse al receptor y desencadenar la respuesta eritropoyética. El segundo, y más importante, se basa en las evidencias de la capacidad de la EPO para ejercer un efecto citoprotector *in vivo* durante tiempos cortos y en alta concentración. Por ese motivo, aquellas isoformas menos ácidas que presentan una velocidad de depuración superior y, por consiguiente, no son útiles para fines hematopoyéticos podrían resultar de gran interés en su función citoprotectora.

En primer lugar, a partir del sobrenadante obtenido del cultivo de un clon productor de rhEPO (rhEPO-CHO.K1) en un biorreactor de 25 l operado en modo de perfusión, se purificó en forma exitosa una nueva combinación de isoformas de rhEPO empleando una estrategia de purificación que consistió de cuatro etapas.

La primera etapa, que consistió en la remoción de componentes insolubles, permitió clarificar el sobrenadante, rindiendo un volumen de 18 l con una pureza del 22%. La fase siguiente, de captura, se llevó a cabo mediante cromatografía de pseudoafinidad utilizando un colorante como ligando, que permitió la eliminación de impurezas y, al mismo tiempo, preservó la población completa de isoformas de rhEPO secretadas al medio de cultivo por las células. Se evidenció un alto porcentaje de recuperación (85%) con un aceptable nivel de pureza (71%), siendo el principal contaminante eliminado la BSA.

La etapa de purificación intermedia, que consistió de dos pasos de purificación empleando cromatografías de intercambio iónico, fue un punto clave en el proceso dado que permitió separar dos poblaciones de glicoisformas de rhEPO. Por un lado, una fracción con un patrón de glicoisformas comparable al de la rhEPO hematopoyética y, por otro, una fracción menos ácida que fue denominada *Neuroepoetin* (rhNEPO) y que luego de ser sometida al segundo paso cromatográfico alcanzó un nivel de pureza del 88%.

Como paso final de pulido se empleó una cromatografía HPLC-C4 que permitió alcanzar una pureza final del 99,4%, siendo acorde a la requerida para compuestos biofarmacéuticos.

Por lo tanto, se puede concluir que el proceso de purificación desarrollado resulta una estrategia eficiente, atractiva y de bajo costo ya que no sólo permitió obtener una combinación de glicoisformas menos ácidas de rhEPO (rhNEPO) con alta pureza (99,4%) y con un rendimiento total del 33% sino que además posibilitaría la obtención simultánea de derivados de rhEPO con aplicaciones terapéuticas diferentes.

Con el fin de caracterizar esta nueva variante, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, hematopoyéticas, neuroprotectoras y antiapoptóticas en modelos *in vitro* e *in vivo*, en forma comparativa con la rhEPO empleada como droga hematopoyética y, en algunos casos, con la rhEPO cuyas moléculas de ácido siálico fueron removidas por acción enzimática (rhAEPO).

La caracterización fisicoquímica puso en evidencia que la rhNEPO presentó menor tamaño que la hormona hematopoyética y un tamaño prácticamente similar a la rhEPO completamente desializada, considerando tanto la masa molecular aparente determinada mediante SDS-PAGE como la masa molecular absoluta obtenida por MALDI-TOF.

El análisis de las estructuras de los oligosacáridos unidos mediante enlaces de tipo N se realizó evaluando los oligosacáridos nativos y neutros. Los resultados obtenidos mostraron que la rhNEPO no sólo está enriquecida en estructuras menos sializadas (mono-, di- y tri-sializadas) sino que, además, presenta mayor porcentaje de

estructuras menos ramificadas (di y tri-antenarias) con respecto a la rhEPO. Estas características se tradujeron en una reducción del contenido de ácido siálico del 38% con respecto a la hormona hematopoyética.

La evaluación de la heterogeneidad de isoformas presentes en la rhNEPO llevada a cabo mediante IEF y EC, puso en evidencia que la misma estaba conformada por un total de 9 isoformas, detectadas por EC, con un punto isoeléctrico comprendido entre 4,2 y 6,1, constituyendo la población de isoformas menos ácidas producidas por las células CHO.K1. Además, se observó que las isoformas 7 y 8 estaban presentes en ambas variantes pero en distintas proporciones.

El estudio de la actividad biológica hematopoyética *in vitro* se realizó en las líneas celulares UT-7/EPO y TF-1 evaluándose la capacidad de la rhNEPO y de la rhEPO para estimular su proliferación. En la línea celular UT-7/EPO ambas variantes mostraron ser equipotentes, indicando una afinidad similar por su receptor. Contrariamente, en la línea celular TF-1 la rhNEPO exhibió una afinidad aparente 1,9 veces superior a la de la rhEPO, sugiriendo que el menor número de ramificaciones e inferior contenido de ácido siálico favorecerían la interacción con el EPOR. Sin embargo, a pesar de que la afinidad se preserve o sea mayor según la línea utilizada para el bioensayo, en los estudios realizados *in vivo* empleando ratones normocitémicos la rhNEPO fue 25 veces menos eficiente que la hormona hematopoyética para estimular la eritropoyesis, presentando sólo el 4% de la actividad eritropoyética de la rhEPO.

Para la evaluación de la capacidad neuroprotectora de la rhNEPO y de la rhEPO se emplearon dos líneas celulares con características neuronales o con capacidad para diferenciarse a fenotipo neuronal, las células SH-SY5Y y PC-12. Inicialmente, para ambos sistemas biológicos se seleccionó el inductor de apoptosis y el tiempo de inducción más apropiados que permitiesen estudiar, posteriormente, el efecto de las variantes de rhEPO. En todos los casos, el esquema de tratamiento empleado para analizar el efecto de las variantes de rhEPO consistió en tratar las células durante 24 h previas al estímulo apoptótico y luego en forma concomitante al mismo.

Para la línea celular PC-12, en primer lugar, se determinó que las células debían ser diferenciadas a fenotipo neuronal en presencia de NGF durante 10 días antes de ser empleadas en el bioensayo y se seleccionó como estímulo apoptótico la supresión de suero y NGF durante 48 h, observándose en estas condiciones una diferencia de aproximadamente 45% con respecto al control de crecimiento. El efecto de las variantes de rhEPO se evaluó empleando 7,5 o 37,5 ng.ml⁻¹ de cada molécula ensayada. En esta oportunidad, la reducción de la viabilidad celular observada en el control de muerte (58,4 ± 6,4%) fue revertida en un 17% por la rhEPO únicamente a la

mayor concentración ensayada, mientras que con la rhNEPO se observó una recuperación de la viabilidad celular del 22 al 24% con respecto al control de muerte empleando ambas concentraciones. Este resultado indicaría que la rhNEPO presenta en estas células actividad citoprotectora *in vitro* a concentraciones inferiores con respecto a la rhEPO.

La línea celular SH-SY5Y se empleó en estado proliferativo y diferenciado. Para evaluar el efecto de las variantes de rhEPO en la línea celular indiferenciada se seleccionó como estímulo apoptótico la incubación de las células con 100 μM de 6-OHDA por 24 h, dado que provocó una reducción de la viabilidad del 50% con respecto al control de crecimiento y, al mismo tiempo, tal efecto pudo ser revertido en forma eficiente por el tratamiento con concentraciones decrecientes de rhEPO desde 760 a 23,8 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dentro de este rango se seleccionaron dos concentraciones (190 y 76 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) para evaluar el efecto de la rhNEPO en comparación con la rhEPO. De esta manera, se pudo observar que la rhNEPO fue capaz de proteger la viabilidad celular a ambas concentraciones ensayadas, incrementándola con respecto al control de muerte en aproximadamente 10%, mientras que la rhEPO sólo lo hizo a la mayor concentración. Este comportamiento fue similar al observado en la línea celular PC-12.

Para trabajar con la línea celular SH-SY5Y en forma diferenciada se eligió como estímulo inductor de apoptosis a la estaurosporina, ya que al mismo tiempo ésta es capaz de desencadenar la diferenciación celular hacia fenotipo neuronal. La condición seleccionada para inducir apoptosis y diferenciación fue 25 nM de STP durante 24 h. Posteriormente, se evaluaron dos concentraciones de ambas combinaciones de rhEPO, 190 y 37,5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, y se observó que ambas moléculas permitieron una recuperación de la viabilidad celular de aproximadamente 10% con respecto al control de muerte.

El rol antiapoptótico de la *Neuroepoetin* fue evaluado *in vitro* empleando líneas celulares establecidas (SH-SY5Y indiferenciadas y PC-12 diferenciadas), así como cultivo primario de neuronas corticales de rata. De igual modo que para los ensayos de viabilidad celular, los tratamientos con las variantes de rhEPO se realizaron 24 h previas a la inducción de apoptosis y luego en forma concomitante a la misma.

La evaluación de los cambios ocurridos a nivel de la cromatina se llevó a cabo empleando la metodología de tinción con el colorante Hoechst 33258, en la línea celular SH-SY5 y en el cultivo primario.

Para el ensayo con las células SH-SY5Y en estado proliferativo se seleccionó como estímulo apoptótico la exposición a 6-OHDA 100 μM durante 4 h y para tratamiento con las variantes de rhEPO se emplearon tres concentraciones de cada una (173, 345 y 690 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). En estas condiciones la rhNEPO fue capaz de reducir el

porcentaje de células apoptóticas en aproximadamente 40% a las tres concentraciones evaluadas, mientras que la rhEPO no fue capaz de hacerlo a la menor concentración.

En el cultivo primario de neuronas corticales de ratas se seleccionó como agente inductor de apoptosis al CoCl_2 , y la condición empleada para inducir la muerte fue 600 μM durante 24 h. El tratamiento con 395 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cada variante de rhEPO redujo significativamente la apoptosis respecto del control de muerte. Sin embargo, a la misma masa, la rhNEPO fue más efectiva que la rhEPO ya que fue capaz de disminuir el porcentaje de apoptosis en 40%, mientras que la rhEPO sólo lo hizo en 25%.

Para el estudio en la línea celular PC-12, las células se diferenciaron a fenotipo neuronal en presencia de NGF durante 7 días y, en base al ensayo de proliferación, se empleó como estímulo apoptótico la supresión de SFB y NGF pero en esta oportunidad durante 24 h. En esta ocasión, el tratamiento con 37,5 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de las variantes de rhEPO fue capaz de reducir el porcentaje de apoptosis entre 40 y 60% con respecto al control de muerte.

La caracterización farmacocinética en plasma se realizó empleando diferentes vías de administración, endovenosa y extravasculares (subcutánea e intraperitoneal). Como era esperable, dadas las diferencias observadas en el perfil de glicosilación, la rhNEPO incrementó su depuración plasmática en todas las vías evaluadas con respecto a la rhEPO. Analizando la vía endovenosa, la rhNEPO presentó un tiempo medio de distribución y de eliminación menor que el de la rhEPO y, en consecuencia, un mayor volumen de distribución en estado estacionario.

Con el fin de evaluar si los carbohidratos influían en la absorción y en la biodisponibilidad de la nueva variante, se evaluó lo que ocurría luego de la administración por vía subcutánea e intraperitoneal.

A nivel de absorción de las drogas, se observó que la rhNEPO no presentó diferencias en su T_{max} entre la vía subcutánea e intraperitoneal, mientras que la rhEPO alcanzó su máxima concentración 4 h antes cuando fue administrada por vía intraperitoneal, lo que se vio reflejado en el aumento del TMA luego de la administración subcutánea. Por su parte, la rhNEPO presentó un TMA similar por ambas vías extravasculares, poniendo en evidencia que el proceso de absorción de la rhNEPO no varió según el sitio de inoculación. Por lo tanto, el menor tamaño y la inferior carga neta de la rhNEPO podrían estar favoreciendo la absorción desde el sitio de administración permitiendo que la absorción a través de ambas vías sea similar y, particularmente para el caso de la vía subcutánea, sea significativamente menor el TMA con respecto a la rhEPO.

Al analizar la biodisponibilidad se observó que la fracción de dosis administrada de rhNEPO que alcanzó la circulación sistémica, por cualquiera de las vías, no superó el 45% y fue significativamente inferior a la de la rhEPO. No obstante, la administración intraperitoneal permitió que una mayor fracción de la dosis administrada llegue al torrente sanguíneo luego de los procesos de absorción y distribución.

Teniendo en cuenta que esta nueva variante de rhEPO se postula como un posible agente neuroprotector, es de suma importancia evaluar si es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica del mismo modo que se ha reportado para la rhEPO. Por tal motivo, se evaluó la capacidad de la rhNEPO para alcanzar el líquido cefalorraquídeo luego de ser administrada por vía endovenosa o intraperitoneal en forma comparativa a la hormona hematopoyética. A pesar de su reducida vida media plasmática, por ambas vías estudiadas la rhNEPO fue capaz de ingresar al líquido cefalorraquídeo más rápidamente que su contraparte hematopoyética en concentraciones dentro del rango de citoprotección, siendo detectada en dicho fluido a los 5 min cuando se utilizó la vía endovenosa y a los 30 min cuando se empleó la vía intraperitoneal, mientras que la rhEPO lo hizo a los 30 min y 2 h, respectivamente. Para ambas moléculas la máxima concentración alcanzada en LCR estuvo comprendida entre 0,06 y 0,11% de la máxima concentración plasmática, no existiendo diferencias entre ellas.

Considerando que un agente neuroprotector se aplica generalmente en condiciones de injuria neuronal y que, a su vez, en tal condición la integridad de la BHE está comprometida, se evaluó una estrategia para lograr la apertura osmótica de la misma utilizando una solución hiperosmolar de manitol, con el objeto de analizar si el pasaje de las moléculas de rhEPO se vería afectado en dicha situación o si tal estrategia sería útil en aquellas patologías en las que la integridad de la barrera permanece intacta. Para tal fin, se administraron en forma endovenosa las variantes de rhEPO en una solución de manitol 1,1M y se observó que, si bien el porcentaje de transferencia se mantuvo prácticamente constante, la rhNEPO alcanzó una concentración máxima 1,6 veces mayor que la obtenida en ausencia de este polialcohol. Por su parte, la rhEPO no alcanzó mayores concentraciones sino que fue detectada más tempranamente en LCR.

Por otra parte, mediante el establecimiento de un vínculo de colaboración con el Laboratorio de Neurotoxicidad, Neuroprotección y Neuroreparación del Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Profesor E. De Robertis" (UBA-CONICET), se evaluó el efecto neuroprotector de las variantes de rhEPO en un modelo de daño neuronal *in vivo* provocado por oclusión de la arteria cerebral media empleando ratones Balb/c. El

tratamiento con ambas variantes de rhEPO no afectaron ni la ingesta de alimentos ni el peso corporal de los animales.

Con el fin de evaluar el efecto de la MCAO y de los tratamientos sobre el estado neurológico global, se aplicó la escala neurológica propuesta por Hatcher y col. (2000) y se observó que los animales controles que recibieron los distintos tratamientos no sufrieron cambios en su IDN, mientras que la MCAO sí ocasionó un incremento del IDN. Los tratamientos con ambas variantes de rhEPO permitieron una recuperación del estado neurológico global al D7 que no fue reflejada en los animales tratados sólo con vehículo.

El estudio de la incidencia de la MCAO y de los tratamientos sobre la actividad motora de los animales se evaluó aplicando tres pruebas reportadas en bibliografía para tal fin. Sin embargo, ninguna de ellas fue capaz de poner en evidencia el efecto de la MCAO y, por lo tanto, no fue posible evaluar la influencia de los tratamientos con rhNEPO y rhEPO. Por ese motivo, a los fines de completar dicho estudio, sería necesario seleccionar otras pruebas que permitiesen analizar cambios en la actividad sensoromotora.

El daño tisular ocasionado por la MCAO fue determinado mediante la medición del volumen de tejido infartado, y se observó que ambas variantes tendieron a disminuir el volumen de infarto del tejido cerebral entre 35% y 42%.

Con el objeto de completar el estudio, se realizó la evaluación de distintos marcadores celulares que se encuentran afectados por la MCAO, tales como las proteínas MAP2, NF-200 y GFAP. Las dos primeras asociadas a las neuronas permitieron poner en evidencia que la MCAO provocó una disminución de la expresión de NF-200 únicamente en la región CA1 del hipocampo, que pudo ser revertida por el tratamiento con las variantes de rhEPO, mientras que la expresión de MAP2 no disminuyó por causa de la MCAO pero sí se observó un incremento significativo de su expresión en aquellos animales tratados con ambas moléculas. Por lo tanto, la rhNEPO permitiría una recuperación de la arborización dendrítica y una preservación de la estructura neuronal.

Por otra parte, el estudio de los cambios en la expresión de la proteína GFAP posibilitó la evaluación del efecto de los tratamientos y de la MCAO sobre la astrogliosis reactiva. En este caso, se observó que la MCAO provocó un incremento de la respuesta astrocitaria tanto en la corteza como en la región CA1 del hipocampo. No obstante, los tratamientos con las variantes de rhEPO mantuvieron la astrogliosis reactiva dentro de los valores basales en la región CA1 del hipocampo.

Por último, con el fin de evaluar si la rhNEPO afecta la producción de glóbulos rojos de igual modo que la rhEPO luego del tratamiento efectuado en el modelo *in*

vivo, se determinó el hematocrito de los animales y se pudo observar que, si bien la rhNEPO incrementó su valor con respecto al grupo tratado sólo con vehículo, éste fue significativamente inferior (20%) con respecto al observado para la rhEPO.

Por lo tanto, se puede decir que los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis permiten postular a la nueva combinación de rhEPO (*Neuroepoetin*), obtenida luego de cuatro etapas de purificación, como un potencial agente neuroprotector, ya que cumple con varias de las características requeridas para dicha función. De hecho, es una molécula segura dado que deriva de una droga actualmente utilizada y, además, no sólo demostró un efecto citoprotector en ensayos de viabilidad celular que fue corroborado en ensayos de apoptosis, poniendo en evidencia su capacidad antiapoptótica, sino que también demostró un rol neuroprotector en un modelo *in vivo* de daño neuronal isquémico luego de ser administrada por vía intraperitoneal con un reducido efecto hematopoyético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“Para ser un buscador real de la verdad es necesario que al menos una vez en tu vida dudes, tanto como sea posible, de todas las cosas”.

Paulo Roberto



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamcio, B., Sargin, D., Stradomska, A., Medrihan, L., Gertler, C., Theis, F. y col. (2008). *Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory*. BMC Biol. 6: 37.
- Agnello, D., Bigini, P., Villa, P., Mennini, T., Cerami, A., Brines, M.L. y col. (2002). *Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Res. 952(1): 128-134.
- Akita, K., Okamura, H., Yoshida, K., Morimoto, H., Ogawa-Iyehara, H. y Haneji, T. (2007). *Cobalt chloride induces apoptosis and zinc chloride suppresses cobalt-induced apoptosis by Bcl-2 expression in human submandibular gland HSG cells*. Int. J. Oncol. 31(4): 923-929.
- Al Okail, M.S. (2010). *Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line*. J. Saudi Chem. Soc. 14(2): 197-201.
- Alfaro Moreno, E., Garcia Cuellar, C. y Duenas Gonzalez, A. (2000). *Metodos de deteccion de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones*. Rev. Inst. Nac. Cancerol. (Mex). 46(4): 275-280.
- Alnaeeli, M., Wang, L., Pikhova, B., Rogers, H., Li, X. y Noguchi, C.T. (2012). *Erythropoietin in brain development and beyond*. Anat. Res. Int. 2012: 1-15.
- Amadeo, G., Cipolatti, A., Perotti, N., Etcheverrigaray, M. y Kratje, R. *Comparación de la calidad de rhEPO purificada a partir de diferentes sistemas de cultivo*. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Mendoza, Argentina, 25 al 27 de Noviembre de 1998, p. 14.
- Andoh, T., Echigo, N., Kamiya, Y., Hayashi, M., Kudoh, I. y Goto, T. (2011). *Effects of erythropoietin on intracellular calcium concentration of rat primary cortical neurons*. Brain Res. 1387: 8-18.
- Arango-Davila, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez, G.P. y Pimienta-Jiménez, H. (2004). *Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica*. Rev. Neurol. 39(2): 16-31.
- Arcasoy, M.O. (2008). *The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin*. Br. J. Haematol. 141(1): 14-31.
- Aronowski, J., Cho, K.H., Strong, R. y Grotta, J.C. (1999). *Neurofilament proteolysis after focal ischemia; when do cells die after experimental stroke?* J. Cereb. Blood Flow Metab. 19(6): 652-660.
- Ascensao, J.L., Gaylis, F., Bronson, D., Fraley, E.E. y Zanjani, E.D. (1983). *Erythropoietin production by a human testicular germ cell line*. Blood 62: 1132-1134.
- Avezum, A., Cantú, C., González-Zuelgaray, J., True Hills, M., Lobban MBE, T., Massaro, A. y col. (2011). *¿Cómo reducir los accidentes cerebrovasculares en Latinoamérica?* p. 1-99.
- Banerjee, D., Rodriguez, M., Nag, M. y Adamson, J.W. (2000). *Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity*. Kidney Int. 57(5): 1895-1904.
- Banks, W.A., Jumbe, N.L., Farrell, C.L., Niehoff, M.L. y Heatherington, A.C. (2004). *Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa*. Eur. J. Pharmacol. 505(1-3): 93-101.
- Barone, F.C., Knudsen, D.J., Nelson, A.H., Feuerstein, G.Z. y Willette, R.N. (1993). *Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 13(4): 683-692.
- Batistatou, A. y Greene, L.A. (1991). *Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation*:

- correlation with suppression of endonuclease activity*. J. Cell Biol. 115(2): 461-471.
- Bazan, J.F. (1990). *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(18): 6934-6938.
- Beccaria, A. (2000). Tesis Doctoral: *Proteínas recombinantes. Optimización de procesos de producción mediante cultivos celulares*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Belter, P.A., Cussler, E.L. y Hu, W.-S. (1988). *Bioseparations: downstream processing for biotechnology*. Wiley. New York, EE. UU.
- Bellavance, M.A., Blanchette, M. y Fortin, D. (2008). *Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy*. AAPS J 10(1): 166-177.
- Berkingali, N., Warnecke, A., Gomes, P., Paasche, G., Tack, J., Lenarz, T. y col. (2008). *Neurite outgrowth on cultured spiral ganglion neurons induced by erythropoietin*. Hearing Res. 243(1-2): 121-126.
- Bernaudin, M., Bellail, A., Marti, H.H., Yvon, A., Vivien, D., Duchatelle, I. y col. (2000). *Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain*. Glia 30(3): 271-278.
- Bernaudin, M., Marti, H.H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T. y col. (1999). *A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 19(6): 643-651.
- Besarab, A., Hörl, W.H. y Silverberg, D. (2009). *Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome*. Oncologist 14: 22-33.
- Biedler, J.L., Helson, L. y Spengler, B.A. (1973). *Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture*. Cancer Res. 33(11): 2643-2652.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. y Freedman, L.S. (1978). *Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones*. Cancer Res. 38(11 Pt 1): 3751-3757.
- Boissel, J.P., Lee, W.R., Presnell, S.R., Cohen, F.E. y Bunn, H.F. (1993). *Erythropoietin structure-function relationships*. J. Biol. Chem. 268(21): 15983-15993.
- Boix, J., Llecha, N., Yuste, V.J. y Comella, J.X. (1997). *Characterization of the cell death process induced by staurosporine in human neuroblastoma cell lines*. Neuropharmacology 36(6): 811-821.
- Bonsdorff, E.V.A. y Jalavisto, E. (1948). *A Humoral Mechanism in Anoxic Erythrocytosis*. Acta Physiol. Scand. 16(2-3): 150-170.
- Bottomley, S.S. y Muller-Eberhard, U. (1988). *Pathophysiology of heme synthesis*. Semin. Hematol. 25(4): 282-302.
- Bouet, V., Freret, T., Toutain, J., Divoux, D., Boulouard, M. y Schumann-Bard, P. (2007). *Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse*. Exp. Neurol. 203(2): 555-567.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brines, M. y Cerami, A. (2008). *Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response*. J. Intern. Med. 264(5): 405-432.
- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M. y col. (2004). *Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14907-14912.
- Brines, M., Patel, N.S.A., Villa, P., Brines, C., Mennini, T., De Paola, M. y col. (2008). *Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 10925-10930.

- Brines, M.L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N.C., Cerami, C. y col. (2000). *Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(19): 10526-10531.
- Brooks, S.P. y Dunnett, S.B. (2009). *Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide*. Nat. Rev. Neurosci. 10(7): 519-529.
- Brown, R.C., Egleton, R.D. y Davis, T.P. (2004). *Mannitol opening of the blood-brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not $^{86}\text{Rb}^+$ or albumin*. Brain Res. 1014(1-2): 221-227.
- Browne, J.K., Cohen, A.M., Egrie, J.C., Lai, P.H., Lin, F.K., Strickland, T. y col. (1986). *Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 693-702.
- Buemi, M., Allegra, A., Corica, F., Floccari, F., Avella, D.D., Aloisi, C. y col. (2000). *Intravenous recombinant erythropoietin does not lead to an increase in cerebrospinal fluid erythropoietin concentration*. Nephrol. Dial. Transplant. 15: 422-423.
- Byrne, B., Donohoe, G.G. y O'Kennedy, R. (2007). *Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells*. Drug Discov. Today 12(7): 319-326.
- Byts, N., Samoylenko, A., Fasshauer, T., Ivanisevic, M., Hennighausen, L., Ehrenreich, H. y col. (2008). *Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin*. Cell Death Differ. 15(4): 783-792.
- Caltana, L., Merelli, A., Lazarowski, A. y Brusco, A. (2009). *Neuronal and glial alterations due to focal cortical hypoxia induced by direct cobalt chloride (CoCl_2) brain injection*. Neurotox. Res. 15(4): 348-358.
- Camargo-De-Morais, M., De Freitas, M., De Mattos, A.G., Schroder, N., Zilles, A.C., Lisboa, C.S. y col. (1996). *Effects of brain ischemia on intermediate filaments of rat hippocampus*. Neurochem. Res. 21(5): 595-602.
- Carlini, R.G., Reyes, A.A. y Rothstein, M. (1995). *Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro*. Kidney Int. 47(3): 740-745.
- Carnot, P. y DeFlander, C. (1906). *Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang*. C. R. Acad. Sci. 143: 384-386.
- Carr, P.D., Gustin, S.E., Church, A.P., Murphy, J.M., Ford, S.C., Mann, D.A. y col. (2001). *Structure of the complete extracellular domain of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer configuration*. Cell 104(2): 291-300.
- Ceaglio, N., Orozco, G., Etcheverrigaray, M., Mattio, M., Kratje, R., Perotti, N. y col. (2013). *High performance collection of cerebrospinal fluid in rats: Evaluation of erythropoietin penetration after osmotic opening of the blood-brain barrier*. J. Neurosci. Meth. 219(1): 70-75.
- Cernaianu, G., Brandmaier, P., Scholz, G., Ackermann, O.P., Alt, R., Rothe, K. y col. (2008). *All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit*. J. Pediatr. Surg. 43(7): 1284-1294.
- Ciccarone, V., Spengler, B.A., Meyers, M.B., Biedler, J.L. y Ross, R.A. (1989). *Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages*. Cancer Res. 49(1): 219-225.
- Cook, J.A. y Mitchell, J.B. (1989). *Viability measurements in mammalian cell systems*. Anal. Biochem. 179(1): 1-7.
- Cotes, P.M. y Bangham, D.R. (1961). *Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythaemic by exposure to air at a reduced pressure*. Nature 191: 1065-1067.
- Council of Europe. (2005). *European Pharmacopoeia* (5th ed. Vol. 2). EDQM Council of Europe. Strasbourg, Francia. p. 1528-1532.
- Cuenca-lópez, M.D., Brea, D., Segura, T., Galindo, M.F., Antón-martínez, D. y Agulla, J. (2010). *La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral* :

- respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Rev. Neurol.* 50: 349-359.
- Cutler, D.J. (1978). *Theory of the mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies.* *J. Pharm. Pharmacol.* 30(8): 476-478.
- Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M. y Diederich, M. (2011). *Erythropoietin, erythropoiesis and beyond.* *Biochem. Pharmacol.*
- Chattopadhyay, A., Choudhury, T.D., Bandyopadhyay, D. y Datta, A.G. (2000). *Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical.* *Biochem. Pharmacol.* 59(4): 419-425.
- Cheetham, J.C., Smith, D.M., Aoki, K.H., Stevenson, J.L., Hoeffel, T.J., Syed, R.S. y col. (1998). *NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation.* *Nat. Struct. Biol.* 5(10): 861-866.
- Cheng, M.H., Lin, L.L., Liu, J.Y. y Liu, A.J. (2012). *The outcomes of stroke induced by middle cerebral artery occlusion in different strains of mice.* *CNS Neurosci. Ther.* 18(9): 794-795.
- Chikuma, M., Masuda, S., Kobayashi, T., Nagao, M. y Sasaki, R. (2000). *Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus.* *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 279(6): 1242-1248.
- Chin, K., Yu, X., Beleslin-Cokic, B., Liu, C., Shen, K., Mohrenweiser, H.W. y col. (2000). *Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain.* *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81: 29-42.
- Chong, Z.Z., Kang, J.Q. y Maiese, K. (2002). *Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases.* *Circulation* 106(23): 2973-2979.
- Christensen, M.C., Previgliano, I., Capparelli, F.J., Lerman, D., Lee, W.C. y Wainsztein, N.A. (2009). *Acute treatment costs of intracerebral hemorrhage and ischemic stroke in Argentina.* *Acta Neurol. Scand.* 119(4): 246-253.
- Darling, R.J., Kuchibhotla, U., Glaesner, W., Micanovic, R., Witcher, D.R. y Beals, J.M. (2002). *Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions.* *Biochemistry* 41(49): 14524-14531.
- Das, K.P., Freudenrich, T.M. y Mundy, W.R. (2004). *Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures.* *Neurotoxicol. Teratol.* 26(3): 397-406.
- Dawson, T.M. (2002). *Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin?* *Lancet* 359(9301): 96-97.
- De Franciscis, P., De Bella, G., Cifaldi, S. y Mastursi, B. (1964). *Attività eritropoietica di un omogenato di milza dopo frazionamento su colonna di idrossilapatite.* *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 40(24): 1771-1772.
- de Klerk, G., Kruiswijk, C., Hart, A.A. y Goudsmit, R. (1978). *Modified method of erythropoietin (ESF) bioassay in vitro using mouse fetal liver cells. I. Effect of serum iron on ⁵⁹Fe incorporation into heme.* *Blood* 52(3): 560-568.
- de la Rosa, E., Diaz, B. y Sánchez, N. (2000). *Muerte celular programada: Un proceso clave en fisiología y patología.* *Cien. Día Int.* 3(3): 1-13.
- Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T. y col. (1992). *Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin.* *Biochemistry* 31(41): 9871-9876.
- Díaz Martín, D. (2006). Tesis Doctoral: *Desarrollo de nuevas metodologías para la enumeración de células en cultivo y la cuantificación de la apoptosis.* Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá. Madrid, España.
- Dichter, M.A., Tischler, A.S. y Greene, L.A. (1977). *Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line.* *Nature* 268(5620): 501-504.
- Digicaylioglu, M. (2006). *Erythropoietin and neuroprotection in the central nervous system: intracellular signaling pathways.* En: *Erythropoietin and the Nervous System* (Eds.: Höke, A.). Springer, EE.UU, p. 32-48.

- Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.a., Bauer, C.y col. (1995). *Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3717-3720.
- Dioum, E.M., Chen, R., Alexander, M.S., Zhang, Q., Hogg, R.T., Gerard, R.D.y col. (2009). *Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1*. Science 324: 1289-1293.
- Drexler, H.G., Zaborski, M. y Quentmeier, H. (1997). *Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent leukemia cell lines*. Leukemia 11(5): 701-708.
- Dringen, R. y Hirrlinger, J. (2003). *Glutathione pathways in the brain*. Biol. Chem. 384(4): 505-516.
- Dubé, S., Fisher, J.W. y Powell, J.S. (1988). *Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function*. J. Biol. Chem. 263(33): 17516-17521.
- Ebendal, T. (1989). *NGF in CNS: experimental data and clinical implications*. Prog. Growth Factor Res. 1(3): 143-159.
- Ebert, B.L. y Bunn, H.F. (1999). *Regulation of the erythropoietin gene*. Blood 94: 1864-1877.
- Egrie, J.C. y Browne, J.K. (2001). *Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP)*. Nephrol. Dial. Transplant. 16: 3-13.
- Egrie, J.C., Strickland, T.W., Lane, J., Aoki, K., Cohen, A.M., Smalling, R.y col. (1986). *Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin*. Immunobiology 172(3-5): 213-224.
- Ehrenreich, H., Degner, D., Meller, J., Brines, M., Béhé, M., Hasselblatt, M.y col. (2004). *Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia*. Mol. Psychiatry 9: 42-54.
- Elliott, S., Lorenzini, T., Chang, D., Barzilay, J. y Delorme, E. (1997). *Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin*. Blood 89(2): 493-502.
- Elliott, S., Lorenzini, T., Chang, D., Barzilay, J., Delorme, E., Giffin, J.y col. (1996). *Fine-structure epitope mapping of antierythropoietin monoclonal antibodies reveals a model of recombinant human erythropoietin structure*. Blood 87(7): 2702-2713.
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q.-w., Coleman, T., Kreilgaard, M.y col. (2003). *Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 6741-6746.
- Erslev, A. (1953). *Humoral regulation of red cell production*. Blood 8(4): 349-357.
- Evrard, S.G., Duhalde-Vega, M., Tagliaferro, P., Mirochnic, S., Caltana, L.R. y Brusco, A. (2006). *A low chronic ethanol exposure induces morphological changes in the adolescent rat brain that are not fully recovered even after a long abstinence: an immunohistochemical study*. Exp. Neurol. 200(2): 438-459.
- Fandrey, J. (2004). *Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286(6): R977-R988.
- Fandrey, J. y Bunn, H.F. (1993). *In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction*. Blood 81: 617-623.
- Fodinger, M., Fritsche-Polanz, R., Buchmayer, H., Skoupy, S., Sengoelge, G., Horl, W.H.y col. (2000). *Erythropoietin-inducible immediate-early genes in human vascular endothelial cells*. J. Investig. Med. 48(2): 137-149.
- Freret, T., Bouet, V., Leconte, C., Roussel, S., Chazalviel, L., Divoux, D.y col. (2009). *Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test*. Behav. Neurosci. 123(1): 224-230.
- Freshney, R. (2000a). Cell Lines. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc. New Jersey, EE.UU. p. 177-193.
- Freshney, R. (2000b). Cryopreservation. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc. New Jersey, EE.UU. p. 297-308.

- Galinsky, R.E. y Svensson, C.K. (1995). *Farmacocinética básica*. En: *Farmacía 19ª Edición* (Eds.: Gennaro, A.R.). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, p. 1070-1093.
- García Rodríguez, J.C. y Sosa Teste, I. (2009). *The Nasal Route as a Potential Pathway for Delivery of Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in Humans*. *ScientificWorldJournal* 9: 970-981.
- Gee, P. y Davison, A.J. (1989). *Intermediates in the aerobic autoxidation of 6-hydroxydopamine: relative importance under different reaction conditions*. *Free Radical Biol. Med.* 6(3): 271-284.
- Genc, S., Akhisaroglu, M., Kuralay, F. y Genc, K. (2002). *Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro*. *Neurosci. Lett.* 321(1-2): 73-76.
- Ghezzi, P. y Brines, M. (2004). *Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine*. *Cell Death Differ.* 11: 37-44.
- Gillespie, W.R. (1991). *Noncompartmental versus compartmental modelling in clinical pharmacokinetics*. *Clin. Pharmacokinet.* 20(4): 253-262.
- Ginsberg, M.D. (1997). *Injury Mechanisms in the Ischaemic Penumbra - Approaches to Neuroprotection in Acute Ischaemic Stroke*. *Cerebrovasc. Dis.* 7(2): 7.
- Glucksmann, A. (1951). *Cell death in normal vertebrate ontogeny*. *Biol. Rev.* 26(1): 59-86.
- Goochee, C.F., Gramer, M.J., Andersen, D.C., Bahr, J.B. y Rasmussen, J.R. (1991). *The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties*. *Biotechnology*. (N. Y.) 9(12): 1347-1355.
- Grasso, G., Sfacteria, A., Cerami, A. y Brines, M. (2004). *Erythropoietin as a Tissue-Protective Cytokine in Brain Injury: What Do We Know and Where Do We Go?* *Neuroscientist* 10(2): 93-98.
- Greene, A.E., Athreya, B., Lehr, H.B. y Coriell, L.L. (1967). *Viability of cell cultures following extended preservation in liquid nitrogen*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124(4): 1302-1307.
- Greene, L.A. y Tischler, A.S. (1976). *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73(7): 2424-2428.
- Gunning, P.W., Landreth, G.E., Layer, P., Ignatius, M. y Shooter, E.M. (1981). *Nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells: evaluation of changes in RNA and DNA metabolism*. *J. Neurosci.* 1(4): 368-379.
- Guo, S., Yan, J., Yang, T., Yang, X., Bezar, E. y Zhao, B. (2007). *Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway*. *Biol. Psychiatry* 62(12): 1353-1362.
- Haase, V.H. (2010). *Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism*. *American journal of physiology: Renal physiology* 299(1): 1-13.
- Haase, V.H. (2013). *Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors*. *Blood Rev.* 27: 41-53.
- Halliwel, B. (2006). *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* *J. Neurochem.* 97(6): 1634-1658.
- Ham, A. y Cormack, D. (1986). *Tratado de Histología* (8va ed.). Interamericana. México.
- Hara, H., Hiramatsu, H. y Adachi, T. (2007). *Pyroloquinoline quinone is a potent neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity*. *Neurochem. Res.* 32(3): 489-495.
- Hartikka, J. y Hefti, F. (1988). *Comparison of nerve growth factor's effects on development of septum, striatum, and nucleus basalis cholinergic neurons in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 21(2-4): 352-364.

- Hasegawa, T. (1996). *History and evolution of culture maintenance and preservation techniques*. En: *Maintaining cultures for biotechnology and industry* (Eds.: Hunter-Cevera, J.C. y Belt, A.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU., p. 15-27.
- Hatcher, J.P., Virley, D., Hadingham, S.J., Roberts, J., Hunter, A.J. y Parsons, A.A. (2002). *The behavioural effect of middle cerebral artery occlusion on apolipoprotein-E deficient mice*. *Behav. Brain Res.* 131(1-2): 139-149.
- Hatten, M.E., Liem, R.K., Shelanski, M.L. y Mason, C.A. (1991). *Astroglia in CNS injury*. *Glia* 4(2): 233-243.
- Hattori, K., Lee, H., Hurn, P.D., Crain, B.J., Traystman, R.J. y DeVries, A.C. (2000). *Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice*. *Stroke* 31(8): 1939-1944.
- Haviv, R., Lindenboim, L., Li, H., Yuan, J. y Stein, R. (1997). *Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells*. *J. Neurosci. Res.* 50(1): 69-80.
- Hay, R.J. (1986). *Preservation and characterization*. En: *Animal cell culture. A practical approach*. (Eds.: Freshney, R.). IRL Press, Oxford, Inglaterra, p. 71-112.
- Hengartner, M.O. (1997). *Apoptosis and the shape of death*. *Dev. Genet.* 21(4): 245-248.
- Heyman, S.N., Rosen, S. y Rosenberger, C. (2011). *Hypoxia-inducible factors and the prevention of acute organ injury*. *Crit.Care.* 15(2): 209.
- Hoffman, R., Benz, E.J., Shattil, S., Furie, B. y Cohen, H.J. (1991). *Hematology : basic principles and practice*. Churchill-Livingstone. New York, EE.UU.
- Hossmann, K.A. (2008). *Cerebral ischemia: models, methods and outcomes*. *Neuropharmacology* 55(3): 257-270.
- Hua, Y., Schallert, T., Keep, R.F., Wu, J., Hoff, J.T. y Xi, G. (2002). *Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat*. *Stroke* 33(10): 2478-2484.
- Huang, K.T., Chen, Y.H. y Walker, A.M. (2004). *Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids*. *BioTechniques* 37(3): 406, 408, 410-402.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. y Bunn, H.F. (1998). *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(14): 7987-7992.
- Hwang, I.K., Koh, U.S., Lee, J.C., Yoo, K.Y., Song, J.H., Jung, J.Y. y col. (2005). *Transient ischemia-induced changes of neurofilament 200 kDa immunoreactivity and protein content in the main olfactory bulb in gerbils*. *J. Neurol. Sci.* 239(1): 59-66.
- Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K. y Silvennoinen, O. (1995). *Signaling through the hematopoietic cytokine receptors*. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 369-398.
- Imagawa, S. (2003). *A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1 , TNF- , or L-NMMA*. *FASEB J.* 17(12): 1742-1744.
- Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oh-Eda, M., Fujiwara, M. y col. (1990). *Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 194(2): 457-462.
- Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W. y Plzak, L. (1957). *Role of the kidney in erythropoiesis*. *Nature* 179(4560): 633-634.
- Jacobson, M.D., Weil, M. y Raff, M.C. (1997). *Programmed cell death in animal development*. *Cell* 88(3): 347-354.
- Jalava, A., Heikkila, J., Lintunen, M., Akerman, K. y Pahlman, S. (1992). *Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA)*. *FEBS Lett.* 300(2): 114-118.
- Jamiri. (2006). *Schematische Darstellung des EPO-Moleküls*, Corel Draw 9.0. Wikipedia.

- Jelkmann, W. (2002). *The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP*. Eur. J. Haematol. 69(5-6): 265-274.
- Jelkmann, W. (2007). *Erythropoietin after a century of research: younger than ever*. Eur. J. Haematol. 78: 183-205.
- Jelkmann, W. (2011). *Regulation of erythropoietin production*. J. Physiol. (Lond). 589: 1251-1258.
- Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. y Semenza, G.L. (1997). *Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension*. J. Biol. Chem. 272(31): 19253-19260.
- Jones, E. y Cowan, W. (1986). *Tejido Nervioso*. En: *Histología* (Eds.: Weiss, L.). El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, p. 258-337.
- Jourdanet, D. (1863). *De l'anémie des altitudes et de l'anémie en général dans ses rapports avec la pression de l'atmosphère*. J.-B. Baillière. Paris.
- Jourdan, G.W., Dean, L. y Roseman, S. (1971). *The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides*. J. Biol. Chem. 246(2): 430-435.
- Jubinsky, P.T., Krijanovski, O.I., Nathan, D.G., Tavernier, J. y Sieff, C.A. (1997). *The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor*. Blood 90(5): 1867-1873.
- Juul, S.E., Anderson, D.K., Li, Y. y Christensen, R.D. (1998). *Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system*. Pediatr. Res. 43(1): 40-49.
- Juul, S.E., Harcum, J., Li, Y. y Christensen, R.D. (1997). *Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates*. J. Pediatr. 130(3): 428-430.
- Juul, S.E., McPherson, R.J., Farrell, F.X., Jolliffe, L., Ness, D.J. y Gleason, C.A. (2004). *Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin*. Biol. Neonate 85(2): 138-144.
- Kaur, C. y Ling, E.A. (2008). *Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions*. Curr. Neurovasc. Res. 5(1): 71-81.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer 26(4): 239-257.
- Kertesz, N., Wu, J., Chen, T.H., Sucov, H.M. y Wu, H. (2004). *The role of erythropoietin in regulating angiogenesis*. Dev. Biol. 276(1): 101-110.
- Kieran, M.W., Perkins, A.C., Orkin, S.H. y Zon, L.I. (1996). *Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(17): 9126-9131.
- Kim, Y.M., Chung, H.T., Kim, S.S., Han, J.A., Yoo, Y.M., Kim, K.M. y col. (1999). *Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling*. J. Neurosci. 19(16): 6740-6747.
- Kitamura, T., Tojo, A., Kuwaki, T., Chiba, S., Miyazono, K., Urabe, A. y col. (1989). *Identification and analysis of human erythropoietin receptors on a factor-dependent cell line, TF-1*. Blood 73(2): 375-380.
- Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. y Lodish, H.F. (1995). *Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals*. Cell 80(5): 729-738.
- Kobayashi, T., Yanase, H., Iwanaga, T., Sasaki, R. y Nagao, M. (2002). *Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 296: 145-151.
- Köchling, J., Curtin, P.T. y Madan, A. (1998). *Regulation of human erythropoietin gene induction by upstream flanking sequences in transgenic mice*. Br. J. Haematol. 103(4): 960-968.

- Kolb, B., Gibb, R. y Robinson, T.E. (2003). *Brain Plasticity and Behavior*. Curr. Dir. Psychol. Sci. 12(1): 1-5.
- Komatsu, N., Nakauchi, H., Miwa, A., Ishihara, T., Eguchi, M., Moroi, M. y col. (1991). *Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival*. Cancer Res. 51(1): 341-348.
- Komatsu, N., Yamamoto, M., Fujita, H., Miwa, A., Hatake, K., Endo, T. y col. (1993). *Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7*. Blood 82(2): 456-464.
- Konstantinopoulos, P.a., Karamouzis, M.V. y Papavassiliou, A.G. (2007). *Selective modulation of the erythropoietic and tissue-protective effects of erythropoietin: time to reach the full therapeutic potential of erythropoietin*. Biochim. Biophys. Acta 1776: 1-9.
- Koury, S.T., Bondurant, M.C. y Koury, M.J. (1988). *Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization*. Blood 71(2): 524-527.
- Koury, S.T., Bondurant, M.C., Koury, M.J. y Semenza, G.L. (1991). *Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization*. Blood 77(11): 2497-2503.
- Kratje, R.B. y Wagner, R. (1992). *Evaluation of production of recombinant human interleukin-2 in fluidized bed bioreactor*. Biotechnol. Bioeng. 39(2): 233-242.
- Krystal, G. (1983). *A simple microassay for erythropoietin based on 3H-thymidine incorporation into spleen cells from phenylhydrazine treated mice*. Exp. Hematol. 11(7): 649-660.
- Kumar, R., Agarwal, A.K. y Seth, P.K. (1995). *Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine*. J. Neurochem. 64(4): 1703-1707.
- Kummer, J.L., Rao, P.K. y Heidenreich, K.A. (1997). *Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase*. J. Biol. Chem. 272(33): 20490-20494.
- Kumral, A., Gonenc, S., Acikgoz, O., Sonmez, A., Genc, K., Yilmaz, O. y col. (2005a). *Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats*. Biol. Neonate 87(1): 15-18.
- Kumral, A., Tugyan, K., Gonenc, S., Genc, K., Genc, S., Sonmez, U. y col. (2005b). *Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain*. Brain Res. Dev. Brain Res. 160(2): 146-156.
- Kupke, D.W. y Dorrier, T.E. (1978). *Protein concentration measurements: the dry weight*. Methods Enzymol. 48: 155-162.
- La Ferla, K. (2002). *Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kB*. FASEB J. 16(13): 1811-1813.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227(5259): 680-685.
- Lai, P.H., Everett, R., Wang, F.F., Arakawa, T. y Goldwasser, E. (1986). *Structural characterization of human erythropoietin*. J. Biol. Chem. 261(7): 3116-3121.
- Lee-Huang, S. (1984). *Cloning and Expression of Human Erythropoietin cDNA in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(9): 2708-2712.
- Lee, S.M., Nguyen, T.H., Park, M.H., Kim, K.S., Cho, K.J., Moon, D.C. y col. (2004). *EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320(4): 1087-1095.
- Leibo, S.P. y Mazur, P. (1971). *The role of cooling rates in low-temperature preservation*. Cryobiology 8(5): 447-452.

- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M. y col. (2004). *Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic*. Science 305(5681): 239-242.
- Li, F., Chong, Z.Z. y Maiese, K. (2006). *Microglial integrity is maintained by erythropoietin through integration of Akt and its substrates of glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and nuclear factor-kappaB*. Curr. Neurovasc. Res. 3(3): 187-201.
- Li, G., Ma, R., Huang, C., Tang, Q., Fu, Q., Liu, H. y col. (2008). *Protective effect of erythropoietin on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms*. Neurosci. Lett. 442(2): 143-147.
- Li, G.L., Farooque, M., Lewen, A., Lennmyr, F., Holtz, A. y Olsson, Y. (2000). *MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat*. APMIS 108(2): 98-106.
- Li, X., Blizzard, K.K., Zeng, Z., DeVries, A.C., Hurn, P.D. y McCullough, L.D. (2004). *Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender*. Exp. Neurol. 187(1): 94-104.
- Li, Y., Lu, Z., Keogh, C.L., Yu, S.P. y Wei, L. (2007a). *Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 27(5): 1043-1054.
- Li, Y., Lu, Z.Y., Ogle, M. y Wei, L. (2007b). *Erythropoietin prevents blood brain barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice*. Neurochem. Res. 32(12): 2132-2141.
- Liesz, A., Hagmann, S., Zschoche, C., Adamek, J., Zhou, W., Sun, L. y col. (2009). *The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation*. Stroke 40(8): 2849-2858.
- Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V. y Costantini, F. (1996). *Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis*. Genes Dev. 10(2): 154-164.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C., Browne, J., Smalling, R., Egrie, J. y col. (1985). *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(22): 7580-7584.
- Liu, C., Shen, K., Liu, Z. y Noguchi, C.T. (1997). *Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain*. J. Biol. Chem. 272(51): 32395-32400.
- Liu, F. y McCullough, L.D. (2011). *Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls*. J. Biomed. Biotechnol. 2011: 464701.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. (2002). *Interacciones celulares en el desarrollo*. En: *Biología Celular y Molecular* (4 ed.). W. H. Freeman and Company. New York, EE. UU. p. 1044-1050.
- Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S. y Cummins, R. (1989). *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats*. Stroke 20(1): 84-91.
- Lopez, E. y Ferrer, I. (2000). *Staurosporine- and H-7-induced cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells is associated with caspase-2 and caspase-3 activation, but not with activation of the FAS/FAS-L-caspase-8 signaling pathway*. Brain Res. Mol. Brain Res. 85(1-2): 61-67.
- Lovelock, J.E. y Bishop, M.W. (1959). *Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide*. Nature 183(4672): 1394-1395.
- Llop, E., Gutierrez-Gallego, R., Segura, J., Mallorqui, J. y Pascual, J.A. (2008). *Structural analysis of the glycosylation of gene-activated erythropoietin (epoetin delta, Dynepo)*. Anal. Biochem. 383(2): 243-254.
- Maiese, K., Chong, Z.Z., Hou, J. y Shang, Y.C. (2008). *Erythropoietin and oxidative stress*. Curr. Neurovasc. Res. 5(2): 125-142.
- Majid, A., He, Y.Y., Gidday, J.M., Kaplan, S.S., Gonzales, E.R., Park, T.S. y col. (2000). *Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains*. Stroke 31(11): 2707-2714.

- Mandelkow, E., Song, Y.H. y Mandelkow, E.M. (1995). *The microtubule lattice--dynamic instability of concepts*. Trends Cell Biol. 5(7): 262-266.
- Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A. y Mecocci, P. (2005). *Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview*. J. Chromatogr. B 827(1): 65-75.
- Marti, H.H. y Bauer, C. (2006). *Expression of erythropoietin and its receptor in the central nervous system*. En: *Erythropoietin and the nervous system* (Eds.: Höke, A.). Springer, EE.UU, p. 15-31.
- Marti, H.H., Gassmann, M., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Morganti-Kossmann, M.C., Kossmann, T. y col. (1997). *Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain*. Kidney Int. 51(2): 416-418.
- Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.A., Straumann, U., Digicaylioglu, M., Henn, V. y col. (1996). *Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain*. Eur. J. Neurosci. 8(4): 666-676.
- Martinez-Estrada, O.M., Rodriguez-Millan, E., Gonzalez-De Vicente, E., Reina, M., Vilaro, S. y Fabre, M. (2003). *Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability*. Eur. J. Neurosci. 18(9): 2538-2544.
- Masuda, S., Kada, E., Nagao, M. y Sasaki, R. (1999). *In vitro neuroprotective action of recombinant rat erythropoietin produced by astrocyte cell lines and comparative studies with erythropoietin produced by Chinese hamster ovary cells*. Cytotechnology 29(3): 207-213.
- Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F., Jr., Tabira, T. y col. (1993). *Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells*. J. Biol. Chem. 268(15): 11208-11216.
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M. y Sasaki, R. (1994). *A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes*. J. Biol. Chem. 269(30): 19488-19493.
- McCarty, D.M., DiRosario, J., Gulaid, K., Muenzer, J. y Fu, H. (2009). *Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice*. Gene Ther. 16(11): 1340-1352.
- McGill, J.K., Gallagher, L., Carswell, H.V., Irving, E.A., Dominiczak, A.F. y Macrae, I.M. (2005). *Impaired functional recovery after stroke in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat*. Stroke 36(1): 135-141.
- McLeod, D.L., Shreeve, M.M. y Axelrad, A.A. (1974). *Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E*. Blood 44(4): 517-534.
- Melli, G., Keswani, S.C. y Höke, A. (2006). *History and biology of erythropoietin in hematopoietic and non-neural tissues*. En: *Erythropoietin and the nervous system* (Eds.: Höke, A.). Springer, EE.UU, p. 1-13.
- Mennini, T., De Paola, M., Bigini, P., Mastrotto, C., Fumagalli, E., Barbera, S. y col. (2006). *Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo*. Mol. Med. 12(7-8): 153-160.
- Mesner, P.W., Epting, C.L., Hegarty, J.L. y Green, S.H. (1995). *A timetable of events during programmed cell death induced by trophic factor withdrawal from neuronal PC12 cells*. J. Neurosci. 15(11): 7357-7366.
- Milano, F. (2001). *Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Diseño y validación de bioensayos para la valoración biológica in vitro de fármacos*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, T.W., Takeuchi, M., Kobata, A. y Takasaki, S. (1995). *Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin*. Blood 86(11): 4097-4104.
- Miyake, T., Kung, C.K. y Goldwasser, E. (1977). *Purification of human erythropoietin*. J. Biol. Chem. 252(15): 5558-5564.

- Mollereau, C., Zajac, J.M. y Roumy, M. (2007). *Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors*. *Peptides* 28(5): 1125-1128.
- Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheinberg, I.H., Hickman, J. y Ashwell, G. (1971). *The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation*. *J. Biol. Chem.* 246(5): 1461-1467.
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y. y Sasaki, R. (1997). *Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death*. *Neuroscience* 76(1): 105-116.
- Mun, K.C. y Golper, T.A. (2000). *Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation*. *Blood Purif.* 18(1): 13-17.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H.B., Hatori, K., Kobayashi, S. y Kim, S.U. (2001). *Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60(4): 386-392.
- Narhi, L.O., Arakawa, T., Aoki, K.H., Elmore, R., Rohde, M.F., Boone, T. y col. (1991). *The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin*. *J. Biol. Chem.* 266(34): 23022-23026.
- Nederman, T., Karlstrom, E. y Sjodin, L. (1990). *An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line*. *Biologicals* 18(1): 29-34.
- Nemzek, J.A., Bolgos, G.L., Williams, B.A. y Remick, D.G. (2001). *Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site*. *Inflammation Res.* 50(10): 523-527.
- Nicotera, P. y Lipton, S.A. (1999). *Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19(6): 583-591.
- Noguchi, C.T., Asavaritikrai, P., Teng, R. y Jia, Y. (2007). *Role of erythropoietin in the brain*. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 64(2): 159-171.
- Nordqvist, C. (2006). *What Is Neuroprotection?* *Medical News Today*.
- Núñez Figueredo, Y., Bueno Pavón, V., Carrillo Domínguez, C., Jiménez Alemán, N., Valdés Martínez, O., Montero Alejo, V. y col. (2009). *Neuroprotective effect of a nasal formulation of erythropoietin with low sialic acid content*. *Rev. Cubana de Farm.* 43(1): 1-13.
- Oh, D.H., Lee, I.Y., Choi, M., Kim, S.H. y Son, H. (2012). *Comparison of Neurite Outgrowth Induced by Erythropoietin (EPO) and Carbamylated Erythropoietin (CEPO) in Hippocampal Neural Progenitor Cells*. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 16(4): 281-285.
- Olsen, N.V. (2003). *Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin*. *Clin. Infect. Dis.* 37: 323-330.
- Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G. y Nilsson, K. (1981). *Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*. *Int. J. Cancer* 28(5): 583-589.
- Papp, H., Czifra, G., Bodo, E., Lazar, J., Kovacs, I., Aleksza, M. y col. (2004). *Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes*. *Cell. Mol. Life Sci.* 61(9): 1095-1105.
- Pascual Garvi, J.M., González Llanos, F., Prieto Arribas, R., Cerdán, S. y Roda, J.M. (2004). *La barrera hematoencefalica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central*. *Rev. Neurol.* 38(6): 16-31.
- Pregi, N., Vittori, D., Perez, G., Leiros, C.P. y Nesse, A. (2006). *Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells*. *Biochim. Biophys. Acta* 1763(2): 238-246.

- Pregi, N., Wenker, S., Vittori, D., Leiros, C.P. y Nesse, A. (2009). *TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells*. *Exp. Cell Res.* 315(3): 419-431.
- Presgraves, S.P., Ahmed, T., Borwege, S. y Joyce, J.N. (2004). *Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists*. *Neurotox Res* 5(8): 579-598.
- Prince, J.A. y Orelund, L. (1997). *Staurosporine differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cultures exhibit transient apoptosis and trophic factor independence*. *Brain Res. Bull.* 43(6): 515-523.
- Quinzaños-Fresnedo, J., Coronado-Zarco, R., Arch-Tirado, E., Verduzco-Mendoza, A., Del Valle-Cabrera, G. y Alfaro-Rodríguez, A. (2008). *Efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas*. *Cir. Ciruj.* 76(2): 119-125.
- Rabie, T. y Marti, H.H. (2008). *Brain protection by erythropoietin: a manifold task*. *Physiology* 23: 263-274.
- Raff, M.C. (1992). *Social controls on cell survival and cell death*. *Nature* 356(6368): 397-400.
- Ramírez-Expósito, M.J. y Martínez-Martos, J.M. (1998). *Estructura y funciones de la macroglía en el sistema nervioso central. Respuesta a procesos degenerativos*. *Rev. Neurol.* 26(152): 600-611.
- Ransome, M.I. y Turnley, A.M. (2008). *Erythropoietin promotes axonal growth in a model of neuronal polarization*. *Mol. Cell. Neurosci.* 38(4): 537-547.
- Rapoport, S.I. (2000). *Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications*. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20(2): 217-230.
- Rapoport, S.I., Hori, M. y Klatzo, I. (1972). *Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier*. *Am. J. Physiol.* 223(2): 323-331.
- Rautureau, G.J., Day, C.L. y Hinds, M.G. (2010). *Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 11(4): 1808-1824.
- Renzi, M.J., Farrell, F.X., Bittner, A., Galindo, J.E., Morton, M., Trinh, H. y col. (2002). *Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 104(1): 86-95.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roccaro, A.M., Crivellato, E. y Presta, M. (2003). *Erythropoietin as an angiogenic factor*. *Eur. J. Clin. Invest.* 33(10): 891-896.
- Rossert, J. y Eckardt, K.U. (2005). *Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis*. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20(6): 1025-1028.
- Ruscher, K., Freyer, D., Karsch, M., Isaev, N., Megow, D., Sawitzki, B. y col. (2002). *Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model*. *J. Neurosci.* 22(23): 10291-10301.
- Russell, E.S., Neufeld, E.F. y Higgins, C.T. (1951). *Comparison of normal blood picture of young adults from 18 inbred strains of mice*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78(3): 761-766.
- Rynkowski, M.A., Kim, G.H., Garrett, M.C., Zacharia, B.E., Otten, M.L., Sosunov, S.A. y col. (2009). *C3a receptor antagonist attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29(1): 98-107.
- Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S. y col. (1998). *Erythropoietin Prevents Place Navigation Disability and Cortical Infarction in Rats with Permanent Occlusion of the Middle Cerebral Artery*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253(1): 26-32.
- Sakanaka, M., Wen, T.C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M. y col. (1998). *In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(8): 4635-4640.
- Salceda, S. y Caro, J. (1997). *Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes*. *J. Biol. Chem.* 272(36): 22642-22647.

- Sanchez, P.E., Navarro, F.P., Fares, R.P., Nadam, J., Georges, B., Moulin, C. y col. (2009). *Erythropoietin receptor expression is concordant with erythropoietin but not with common beta chain expression in the rat brain throughout the life span*. J. Comp. Neurol. 514(4): 403-414.
- Sargin, D., Friedrichs, H., El-Kordi, A. y Ehrenreich, H. (2010). *Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol 24(4): 573-594.
- Sartelet, H., Fabre, M., Castaing, M., Bosq, J., Racu, I., Lagonotte, E. y col. (2007). *Expression of erythropoietin and its receptor in neuroblastomas*. Cancer 110(5): 1096-1106.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, a. y Fukuda, M. (1987). *Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA*. J. Biol. Chem. 262: 12059-12076.
- Sasaki, H., Ochi, N., Dell, A. y Fukuda, M. (1988). *Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin: analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass spectrometry*. Biochemistry 27(23): 8618-8626.
- Satake, R., Kozutsumi, H., Takeuchi, M. y Asano, K. (1990). *Chemical modification of erythropoietin: an increase in in vitro activity by guanidination*. Biochim. Biophys. Acta 1038(1): 125-129.
- Savino, C., Pedotti, R., Baggi, F., Ubiali, F., Gallo, B., Nava, S. y col. (2006). *Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis*. J. Neuroimmunol. 172(1-2): 27-37.
- Scopes, R.K. (1987). *Dye-ligands and multifunctional adsorbents: an empirical approach to affinity chromatography*. Anal. Biochem. 165(2): 235-246.
- Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L. y Bland, S.T. (2000). *CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury*. Neuropharmacology 39(5): 777-787.
- Schiffer, D., Giordana, M.T., Migheli, A., Giaccone, G., Pezzotta, S. y Mauro, A. (1986). *Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain*. Brain Res. 374(1): 110-118.
- Schlaepfer, W.W., Lee, C., Lee, V.M. y Zimmerman, U.J. (1985). *An immunoblot study of neurofilament degradation in situ and during calcium-activated proteolysis*. J. Neurochem. 44(2): 502-509.
- Schlaepfer, W.W. y Zimmerman, U.J. (1985). *Mechanisms underlying the neuronal response to ischemic injury. Calcium-activated proteolysis of neurofilaments*. Prog. Brain Res. 63: 185-196.
- Schober, A. (2004). *Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP*. Cell Tissue Res. 318(1): 215-224.
- Schubert, D., Heinemann, S. y Kidokoro, Y. (1977). *Cholinergic metabolism and synapse formation by a rat nerve cell line*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74(6): 2579-2583.
- Seyfried, D.M., Han, Y., Yang, D., Ding, J., Savant-Bhonsale, S., Shukairy, M.S. y col. (2008). *Mannitol enhances delivery of marrow stromal cells to the brain after experimental intracerebral hemorrhage*. Brain Res. 1224: 12-19.
- Shargel, L., Wu-Pong, S. y Yu, A.B.C. (2005a). *Multicompartmental models: intravenous bolus administration*. En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division. New York, EE. UU. p. 73-105.
- Shargel, L., Wu-Pong, S. y Yu, A.B.C. (2005b). *Pharmacokinetic of oral absorption*. En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division. New York, EE. UU. p. 161-184.

- Shi, X.R., Hong, Z.Y., Liu, H.R., Zhang, Y.C. y Zhu, Y.Z. (2011). *Neuroprotective effects of SCM198 on 6-hydroxydopamine-induced behavioral deficit in rats and cytotoxicity in neuronal SH-SY5Y cells*. *Neurochem. Int.* 58(8): 851-860.
- Shingo, T., Sorokan, S.T., Shimazaki, T. y Weiss, S. (2001). *Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells*. *J. Neurosci.* 21(24): 9733-9743.
- Sifringer, M., Kaindl, A.M., Endesfelder, S., von Haefen, C., Bendix, I. y Felderhoff-Mueser, U. (2012). *The protective role of erythropoietin in the developing brain*. En: *Preterm Birth - Mother and Child* (Eds.: Morrison, J.). In Tech New York, EEUU, p. 275-298.
- Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nuñez, G. y Fernández-Luna, J.L. (1996). *Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2*. *Blood* 88(5): 1576-1582.
- Sinclair, A.M. y Elliott, S. (2005). *Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins*. *J. Pharm. Sci.* 94(8): 1626-1635.
- Singh, J. y Kaur, G. (2007). *Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures*. *Brain Res.* 1154: 8-21.
- Sirén, A.-I., Knerlich, F., Poser, W., Gleiter, C.H., Bruck, W. y Ehrenreich, H. (2001). *Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic / hypoxic brain*. *Eur. J. Biochem.* 101: 271-276.
- Sirén, A.L. y Ehrenreich, H. (2001). *Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection*. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 251(4): 179-184.
- Siren, A.L., Fasshauer, T., Bartels, C. y Ehrenreich, H. (2009). *Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system*. *Neurotherapeutics* 6(1): 108-127.
- Sofroniew, M.V. (2009). *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. *Trends Neurosci.* 32(12): 638-647.
- Sola, R.J. y Griebenow, K. (2010). *Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy*. *BioDrugs* 24(1): 9-21.
- Solaroglu, I., Solaroglu, A., Kaptanoglu, E., Dede, S., Haberal, A., Beskonakli, E. y col. (2003). *Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain*. *Childs Nerv. Syst.* 19(1): 19-22.
- Song, J.X., Shaw, P.C., Sze, C.W., Tong, Y., Yao, X.S., Ng, T.B. y col. (2010). *Chrysotoxine, a novel bibenzyl compound, inhibits 6-hydroxydopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells via mitochondria protection and NF-kappaB modulation*. *Neurochem. Int.* 57(6): 676-689.
- Sosa, I., Mengana, Y., Garcia, J.C., Garcia, J.D., Subiros, N., Cruz, J. y col. (2008). *La eritropoyetina humana recombinante como terapia para la neuroprotección en la isquemia cerebral*. *Biotechnol. Apl.* 25(3): 216-229.
- Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Munoz-Patino, A.M. y Labandeira-Garcia, J.L. (2000). *Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease*. *J. Neurochem.* 74(4): 1605-1612.
- Spitaler, M. y Cantrell, D.A. (2004). *Protein kinase C and beyond*. *Nat Immunol* 5(8): 785-790.
- Statler, P.A., McPherson, R.J., Bauer, L.A., Kellert, B.A. y Juul, S.E. (2007a). *Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats*. *Pediatr. Res.* 61(6): 671-675.
- Statler, P.A., McPherson, R.J., Bauer, L.A., Kellert, B.A. y Juul, S.E. (2007b). *Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats*. *Pediatr Res* 61(6): 671-675.

- Stohlawetz, P.J., Dzirlo, L., Hergovich, N., Lackner, E., Mensik, C., Eichler, H.G. y col. (2000). *Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans*. *Blood* 95(9): 2983-2989.
- Studer, L., Csete, M., Lee, S.H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B. y col. (2000). *Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen*. *J. Neurosci.* 20(19): 7377-7383.
- Stys, P.K. y Jiang, Q. (2002). *Calpain-dependent neurofilament breakdown in anoxic and ischemic rat central axons*. *Neurosci. Lett.* 328(2): 150-154.
- Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H. y Asou, H. (2002). *Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation*. *Neurosci. Res.* 44(4): 391-403.
- Sun, Z.K., Yang, H.Q., Pan, J., Zhen, H., Wang, Z.Q., Chen, S.D. y col. (2008). *Protective effects of erythropoietin on tau phosphorylation induced by beta-amyloid*. *J. Neurosci. Res.* 86(13): 3018-3027.
- Svennerholm, L. (1957). *Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method*. *Biochim. Biophys. Acta* 24(3): 604-611.
- Syed, R.S., Reid, S.W., Li, C., Cheetham, J.C., Aoki, K.H., Liu, B. y col. (1998). *Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation*. *Nature* 395(6701): 511-516.
- Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibe, N. y col. (1988). *Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells*. *J. Biol. Chem.* 263(8): 3657-3663.
- Tan, C.C., Eckardt, K.U., Firth, J.D. y Ratcliffe, P.J. (1992). *Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia*. *Am. J. Physiol.* 263(3): 474-481.
- Tan, C.C., Eckardt, K.U. y Ratcliffe, P.J. (1991). *Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats*. *Kidney Int.* 40(1): 69-76.
- Taoufik, E., Petit, E., Divoux, D., Tseveleki, V., Mengozzi, M., Roberts, M.L. y col. (2008). *TNF receptor 1 sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(16): 6185-6190.
- Testa, U. (2004). *Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis*. *Leukemia* 18(7): 1176-1199.
- Teste, I.S., Tamos, Y.M., Cruz, Y.R., Cernada, A.M., Rodriguez, J.C., Martinez, N.S. y col. (2012). *Dose effect evaluation and therapeutic window of the neuro-EPO nasal application for the treatment of the focal ischemia model in the Mongolian gerbil*. *ScientificWorldJournal* 2012: 1-12.
- Tilbrook, P.A. y Klinken, S.P. (1999). *Erythropoietin and Erythropoietin Receptor*. *Growth Factors* 17(1): 25-35.
- Tokuda, M. y Hatase, O. (1998). *Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation*. *Mol. Neurobiol.* 17(1-3): 137-156.
- Tsai, P.T., Ohab, J.J., Kertesz, N., Groszer, M., Matter, C., Gao, J. y col. (2006). *A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery*. *J. Neurosci.* 26(4): 1269-1274.
- Tsuchiya, T., Okada, M., Ueda, M. y Yasukochi, Y. (1997). *Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region*. *J. Biochem.* 121(2): 193-196.
- Tsuda, E., Kawanishi, G., Ueda, M., Masuda, S. y Sasaki, R. (1990). *The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin*. *Eur. J. Biochem.* 188: 405-411.
- Um, M., Gross, A. y Lodish, H. (2007). *A classical homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated*

- neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell. Signal.* 19(3): 634-645.
- Uzum, G., Sarper Diler, A., Bahcekapili, N. y Ziya Ziylan, Y. (2006). *Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures.* *Life Sci.* 78(22): 2571-2576.
- Vaghefi, H., Hughes, A.L. y Neet, K.E. (2004). *Nerve growth factor withdrawal-mediated apoptosis in naive and differentiated PC12 cells through p53/caspase-3-dependent and -independent pathways.* *J. Biol. Chem.* 279(15): 15604-15614.
- van der Kooij, M.a., Groenendaal, F., Kavelaars, A., Heijnen, C.J. y van Bel, F. (2008). *Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia.* *Brain Res. Rev.* 59: 22-33.
- Velly, L., Pellegrini, L., Guillet, B., Bruder, N. y Pisano, P. (2010). *Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword?* *Pharmacol. Ther.* 128(3): 445-459.
- Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A. y col. (2003). *Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis.* *J. Exp. Med.* 198(6): 971-975.
- Villa, P., van Beek, J., Larsen, A.K., Gerwien, J., Christensen, S., Cerami, A. y col. (2007). *Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives.* *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27(3): 552-563.
- Visiongain. (2012). *NEUROPROTECTIVE PRODUCTS: WORLD MARKET PROSPECTS 2012-2022*, from <http://www.visiongain.com/Report/819/Neuroprotective-Products-World-Market-Prospects-2012-2022>
- Vives Corrons, J.L. (1998). *Eritropoyesis normal.* En: *Eritropoyetina recombinante humana* (Eds.: Valderrabano, F.). Masson, Barcelona, p. 1-66.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Corsini, E., Villa, P., Ghezzi, P., Garau, A. y col. (2005). *Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor.* *J. Neurochem.* 93(2): 412-421.
- Voyvodic, J.T. (1989). *Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons.* *Nature* 342(6248): 430-433.
- Wagner, D.C., Riegelsberger, U.M., Michalk, S., Hartig, W., Kranz, A. y Boltze, J. (2011). *Cleaved caspase-3 expression after experimental stroke exhibits different phenotypes and is predominantly non-apoptotic.* *Brain Res.* 1381: 237-242.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. y Semenza, G.L. (1995). *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(12): 5510-5514.
- Wang, G.L. y Semenza, G.L. (1995). *Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1.* *J. Biol. Chem.* 270(3): 1230-1237.
- Wang, X.Q. y Vaziri, N.D. (1999). *Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells.* *Hypertension* 33(3): 894-899.
- Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V.A., Frei, U., Wiesener, M. y col. (2004). *Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells.* *FASEB J.* 18(12): 1462-1464.
- Wasley, L.C., Timony, G., Murtha, P., Stoudemire, J., Dorner, A.J., Caro, J. y col. (1991). *The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin.* *Blood* 77(12): 2624-2632.
- Watowich, S.S. (2011). *The erythropoietin receptor: molecular structure and hematopoietic signalin pathways.* *J. Investig. Med.* 59(7): 1067-1072.

- Weber, A., Maier, R.F., Hoffmann, U., Grips, M., Hoppenz, M., Aktas, A.G. y col. (2002). *Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures*. Brain Res. 958(2): 305-311.
- Weimar, C., Kraywinkel, K., Maschke, M. y Diener, H.C. (2006). *Intravenous thrombolysis in German stroke units before and after regulatory approval of recombinant tissue plasminogen activator*. Cerebrovasc. Dis. 22(5-6): 429-431.
- Wen, D., Boissel, J.P., Tracy, T.E., Gruninger, R.H., Mulcahy, L.S., Czelusniak, J. y col. (1993). *Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals*. Blood 82(5): 1507-1516.
- Wenker, S.D., Chamorro, M.E., Vota, D.M., Callero, M.A., Vittori, D.C. y Nesse, A.B. (2010). *Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells*. J. Cell. Biochem. 110(1): 151-161.
- Wiche, G., Oberkanins, C. y Himmler, A. (1991). *Molecular structure and function of microtubule-associated proteins*. Int. Rev. Cytol. 124: 217-273.
- Wiessner, C., Allegrini, P.R., EkatoDRAMIS, D., Jewell, U.R., Stallmach, T. y Gassmann, M. (2001). *Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin*. J. Cereb. Blood Flow Metab. 21(7): 857-864.
- Wise, P.M., Dubal, D.B., Wilson, M.E., Rau, S.W. y Liu, Y. (2001). *Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain*. Front. Neuroendocrinol. 22(1): 33-66.
- World Health Organization. (2006). *Neurological disorders : public health challenges*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. y Lodish, H.F. (1995). *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor*. Cell 83(1): 59-67.
- Wyllie, A.H., Arends, M.J., Morris, R.G., Walker, S.W. y Evan, G. (1992). *The apoptosis endonuclease and its regulation*. Semin. Immunol. 4(6): 389-397.
- Xenocostas, A., Cheung, W.K., Farrell, F., Zakszewski, C., Kelley, M., Lutynski, A. y col. (2005). *The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin*. Eur. J. Clin. Pharmacol. 61(3): 189-195.
- Xie, H.R., Hu, L.S. y Li, G.Y. (2010). *SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Chin. Med. J. (Engl). 123(8): 1086-1092.
- Xiong, S.Q., Xia, X.B., Xu, H.Z. y Jiang, J. (2009). *Suppression of retinal neovascularization by small-interference RNA targeting erythropoietin*. Ophthalmologica 223(5): 306-312.
- Xu, X., Dai, H. y Shi, Y. (2009). *Erythropoietin protects primary cultures of rat cortical neurons from hypoxia-induced toxicity through attenuating both glutamate release and NMDA receptor evoked neurotoxicity pathway*. Pharmazie 64(3): 210-213.
- Yamaoka, K., Nakagawa, T. y Uno, T. (1978). *Statistical moments in pharmacokinetics*. J. Pharmacokinet. Biopharm. 6(6): 547-558.
- Yamashita, T., Nonoguchi, N., Ikemoto, T., Miyatake, S. y Kuroiwa, T. (2010). *Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model*. Neurol. Res. 32(9): 957-962.
- Yang, J., Wadghiri, Y.Z., Hoang, D.M., Tsui, W., Sun, Y., Chung, E. y col. (2011). *Detection of amyloid plaques targeted by USPIO-Aβ1-42 in Alzheimer's disease transgenic mice using magnetic resonance microimaging*. NeuroImage 55(4): 1600-1609.
- Yang, T.T., Sinai, P. y Kain, S.R. (1996). *An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells*. Anal. Biochem. 241(1): 103-108.
- Yi, T., Zhang, J., Miura, O. y Ihle, J.N. (1995). *Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (Epo) receptor after Epo-induced receptor*

- tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites. Blood* 85(1): 87-95.
- Yu, X., Lin, C.S., Costantini, F. y Noguchi, C.T. (2001). *The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. Blood* 98(2): 475-477.
- Yu, X., Shacka, J.J., Eells, J.B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R.M., Beleslin-Cokic, B. y col. (2002). *Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. Development* 129(2): 505-516.
- Yuan, R., Maeda, Y., Li, W., Lu, W., Cook, S. y Dowling, P. (2008). *Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. PloS one* 3(4): 1-11.
- Yuste, V.J., Sanchez-Lopez, I., Sole, C., Encinas, M., Bayascas, J.R., Boix, J. y col. (2002). *The prevention of the staurosporine-induced apoptosis by Bcl-X(L), but not by Bcl-2 or caspase inhibitors, allows the extensive differentiation of human neuroblastoma cells. J. Neurochem.* 80(1): 126-139.
- Zhang, J., Li, Y., Cui, Y., Chen, J., Lu, M., Elias, S.B. y col. (2005). *Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. Brain Res.* 1034(1-2): 34-39.
- Zhang, L., Chopp, M., Zhang, R.L., Wang, L., Zhang, J., Wang, Y. y col. (2010). *Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. PloS one* 5(6): 1-8
- Zhang, L., Schallert, T., Zhang, Z.G., Jiang, Q., Arniago, P., Li, Q. y col. (2002). *A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. J. Neurosci. Meth.* 117(2): 207-214.
- Zhang, S., Chen, X., Yang, Y., Zhou, X., Liu, J. y Ding, F. (2011). *Neuroprotection against cobalt chloride-induced cell apoptosis of primary cultured cortical neurons by salidroside. Mol. Cell. Biochem.* 354(1-2): 161-170.