

PASO DE LA MOLÉCULA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE CON BAJO CONTENIDO DE ÁCIDO SIÁLICO AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL POR LA VÍA INTRANASAL EN LOS MODELOS DEL *Meriones unguiculatus* Y EL PRIMATE NO HUMANO *Macaca fascicularis*

Iliana Sosa*, Janette Cruz**, J. Santana***, Yuneidys Mengana*, J.D García-Salman**, Adriana Muñoz*****, Tamara G. Ozuna* y J.C. García***

*Centro Nacional para la Producción de animales de Laboratorio, Bejucal, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: ccalidad@cenpalab.inf.cu, **Instituto de Neurología y Neurocirugía, 29 y D, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. ***Instituto Superior de Tecnología Aplicada, Ciudad de La Habana, Cuba.

****Centro de Inmunología Molecular, Ciudad de la Habana, Cuba. *****Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue demostrar la llegada al cerebro de la molécula de eritropoyetina recombinante humana, con bajo contenido en ácidos siálicos, administrada por vía nasal en el gerbo de Mongolia y el primate *Macaca fascicularis*, así como la seguridad de aplicación nasal en ambas especies. Se emplearon 18 gerbos de Mongolia a los cuales se les administró eritropoyetina marcada con I¹²⁵. La radioactividad asociada al bulbo olfatorio y al cerebelo fue determinada mediante un contador gamma. En un segundo experimento se administró eritropoyetina por vía nasal en 10 monos. El contenido de eritropoyetina en suero y líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar fue determinado por un ELISA que cuantifica la cantidad de molécula presente por mL. Se detectó un 0,8% de la radioactividad aplicada por la vía nasal, en el bulbo olfatorio, 5 min después de la aplicación en el gerbil de Mongolia. En el *M. fascicularis* se determinó un 0,15% de la dosis aplicada por vía nasal en el líquido cefalorraquídeo lumbar a los 15 min. No se observaron cambios en los parámetros sanguíneos en estas especies. Los resultados sugieren que la vía nasal constituye una alternativa de acceso no invasivo y seguro de la molécula de eritropoyetina humana recombinante al SNC, que puede tener uso como neuroprotector en accidentes cerebrovasculares, que constituyen en la actualidad un problema de salud humana.

(Palabras clave: Eritropoyetina; vía intranasal; *Macaca fascicularis*; cinética; seguridad; gerbo de Mongolia; *Meriones unguiculatus*)

RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN WITH LOW SIALIC ACID PATHWAY TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM BY INTRANASAL ROUTE IN *Meriones unguiculatus* AND NO HUMAN PRIMATE *Macaca fascicularis* MODELS

ABSTRACT: Our propose was to demonstrate the brain access of the recombinant human erythropoietin, with low sialic acid content, in the *Mongolian gerbil* and *Macaca fascicularis*, as well as the safety of nasal administration in both species. Eighteen *Mongolian gerbils* received intranasally I¹²⁵ labelled erythropoietin. Olfactory bulb and cerebellum-associated radioactivity were measured by a gamma counter. In a second experiment, erythropoietin was intranasally administered to 10 monkeys. Erythropoietin content in serum and cerebrospinal fluid obtained by lumbar puncture was determined by an ELISA method. From the intranasal administered radioactivity, a 0,8% was detected in the olfactory bulb at 5 min. In *M. fascicularis*, a 0,15% of the dose was determined in the cerebrospinal fluid 15 min after the intranasal administration. Treatment related-changes in blood parameters in both species were not observed. Results suggest that nasal route may be an alternative, non invasive and sure mode of access to the brain for the erythropoietin, which can be used as neuroprotector in stroke, a current health problem nowadays.

(Key words: erythropoietin; intranasal route; *Macaca fascicularis*; kinetics; safety; Mongolian gerbil; *Meriones unguiculatus*)

INTRODUCCIÓN

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína de la familia de las citoquinas, conocida por su capacidad de incrementar la formación de eritrocitos maduros en la médula ósea y su paso a la sangre. Se ha demostrado que la EPO tiene un efecto citoprotector en otros tejidos como el corazón y el cerebro (41). La producción de EPO endógena en el cerebro está fundamentalmente en las células del hipocampo, cápsula interna, cerebro medio y astrositos, entre otras estructuras (18). La EPO producida en el cerebro no llega a circulación sanguínea y no es susceptible de ser eliminada en el hígado, por lo que la presencia de las moléculas de ácidos siálicos resulta innecesaria (34). El uso terapéutico con las propias moléculas endógenas ha sido muy investigado y resulta un principio básico en la fabricación actual de medicamentos (17).

La eritropoyetina recombinante humana (rHu-EPO) es idéntica a la EPO humana natural (25). La rHu-EPO es homóloga en aproximadamente un 80% a la EPO de roedores (2) y un 90% a la de otros primates (34) y se ha demostrado que es biológicamente activa para las funciones eritropoyéticas y neuroprotectoras en roedores. Se ha reportado su uso en modelos de animales de hemorragia subaracnoidea (1), hemorragia intracraneal (37), trauma craneoencefálico, (31), daño de la médula espinal (20). También se ha demostrado que reduce el daño neuronal funcional en modelos de esclerosis múltiple (12,36), encefalitis alérgicas con disfunciones neurológicas (28,29), mejora la neuropatía del diabético (5), y la isquemia de la retina (4). Recientemente, se ha descrito su acción cardioprotectora en el infarto del miocardio (30,43), y más recientemente se han reportado sus potencialidades como tratamiento en la esquizofrenia (11), la hipoxia perinatal (9,26), y el cáncer (6,27).

Hasta el momento la administración endovenosa de rHu-EPO ha sido la ruta de elección. Sin embargo, como la rHu-EPO tiene un tiempo de vida media en plasma de 5,6 horas, existe el riesgo de estimular la eritropoyesis, lo cual podría dificultar el uso clínico de esta molécula en la isquemia cerebral. Una alternativa es emplear una molécula de rHu-EPO con bajo contenido de ácidos siálicos (rHu-EPOb), similar a la producida de forma endógena en el cerebro durante la hipoxia (32,42). Esta molécula tiene como ventaja una eliminación periférica más rápida. Además, se ha reportado que no aumenta el hematocrito y mantiene un amplio espectro de propiedades neuroprotectoras en roedores (42).

Una posible ruta para hacer llegar moléculas que puedan tener efecto terapéutico o preventivo en daños del SNC es la vía intranasal (3). Además, se ha comprobado que la vía nasal es más rápida que la endovenosa (24).

El objetivo de este trabajo fue demostrar el paso de la molécula de rHu-EPO con bajo contenido en ácido siálico al SNC en dos especies de animales de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Se emplearon gerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) provenientes del CENPALAB y el primate no humano *Macaca fascicularis*. El protocolo de cada ensayo fue discutido y aprobado por el Comité de Ética Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio, que tiene en cuenta lo establecido en las normas internacionales del ICLAS para estos ensayos.

La molécula de rHu-EPO con bajo contenido de ácido siálico (rHu-EPOb), fue suministrada por el Centro de Inmunología Molecular (CIM, Habana, Cuba). La solución de rHu-EPO fue preparada en solución de 0.15 mM, tamponada a pH 7.

Marcaje de la (rHu-EPOb) con ¹²⁵I: la rHu-EPOb se marcó con yodo¹²⁵, según el método descrito (7). A partir de este marcaje radiactivo se preparó una formulación con solución salina de 1 mg/mL para su aplicación por vía nasal (vn).

Procedimientos: Se emplearon 18 gerbos de Mongolia machos de peso corporal entre 70 y 90 g. Todos los animales recibieron entre 100 y 120 ul de la formulación referida por vía intranasal. En intervalos de 5, 30 y 60 minutos los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia. El encéfalo fue removido en menos de 70 segundos. El bulbo olfatorio y el cerebelo fueron disecados. El conteo radiactivo se realizó en un contador gamma.

En el modelo de primate no humano de la especie *Macaca fascicularis* se realizó la evaluación del paso de la molécula por la vía intranasal empleando la dosis de rHu-EPOb a 1mg/mL (1000 UI) aplicados en dosis única. El control positivo se realizó con la aplicación de 5000 UI/mL por vía intravenosa (1 mL). Se extrajo líquido cefalorraquídeo y sangre para suero en diferentes intervalos no menores de 5 minutos hasta la primera hora y una sola extracción a las 2 y 3 horas después de la aplicación. Los animales se distribuyeron en 3 grupos (n = 8):

- Tratado por vía intranasal con rHu-EPOb 1mg/mL (5750 UI/kg; 0.5 mL por cada fosa nasal).
- Tratado por vía intranasal con el vehículo de la formulación de rHu-EPOb) 0.5 mL por cada fosa nasal).
- Tratado por vía intravenosa con rHu-EPOa (5000 UI/mL, 1250 UI/Kg en 1 mL aplicado en el seno venoso femoral, control positivo).

Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se extrajeron de la región lumbar, entre L3 y L4 ó L4 y L5, en primates previamente sedados con ketamina a razón de 10 mg/kg intramuscular. Se mantuvieron durante la evaluación en una silla de restricción garantizando la inmovilidad del animal. Las muestras de sangre para la obtención de suero se extrajeron del seno venoso femoral. Las muestras de líquido cefalorraquídeo y suero fueron congeladas a -20°C hasta su cuantificación.

La determinación de la concentración de rHu-EPO en muestras de líquido cefalorraquídeo y suero, se realizó mediante un ELISA de tipo sándwich, (IBL immuno-biological laboratories, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el porcentaje de radioactividad relativa al total de la radioactividad aplicada. En todas las regiones estudiadas fueron encontrados niveles entre 0,1 y 0,8%. La aplicación intranasal de rHu-EPOb marcada con I¹²⁵ llega a regiones del cerebro en al menos 5 minutos y su contenido va disminuyendo de forma gradual de la región frontal a la caudal.

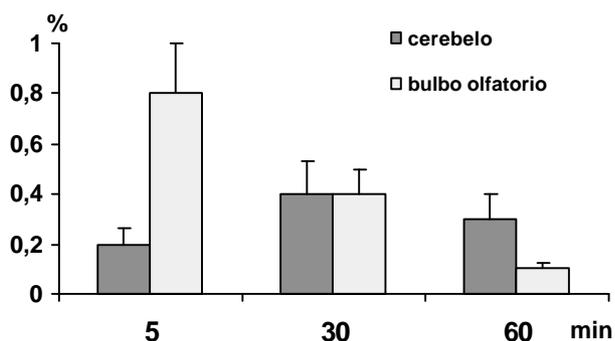


FIGURA 1. Porcentaje de la radiactividad aplicada, determinado en bulbo olfatorio de gerbil de Mongolia, a diferentes tiempos a partir de la aplicación. Las columnas representan el valor promedio de ocho animales \pm DS./ *Applied radioactivity percentage in Mongolian gerbil olfactory bulb at different application times. The columns represent the average in eight animals \pm DS.*

La cavidad nasal está dividida por un tabique óseo y cartilaginosa llamado septo nasal. En la cavidad nasal, la lámina cribiforme del hueso etmoides tiene una mucosa especial llamado epitelio olfativo. Es aquí donde se forman las células que forman los nervios que cruzan a través de la lámina cribiforme a los centros olfativos dentro del cerebro (23). Se sabe que este puede ser el camino para hacer llegar a las proteínas y otras moléculas al SNC por la vía nasal (35,40).

El transporte nasal está generalmente favorecido para los roedores. Por ejemplo, la mucosa olfativa nasal cubre 50% aproximadamente del epitelio nasal total en la rata (22), mientras que en el humano cubre sólo el 5% (24). Otra diferencia importante es el volumen de líquido cefalorraquídeo (LCR), que en la rata es de 3,5 mL y en el humano es de 160 mL (13). Por consiguiente, el tiempo de sustitución del LCR en el roedor es de 1.5 horas, mientras que en el humano es de 5 horas, por lo cual es difícil de inferir la captación de moléculas de una a otra especie. No obstante, se decidió probar el paso de la molécula en el primate no humano *Macaca fascicularis*, especie recomendada en los estudios de farmacocinética de la vía nasal.

En la Figura 2 se muestran los niveles de distribución de rHu-EPO con bajo contenido de ácido siálico en el LCR obtenido por punción lumbar a diferentes intervalos de tiempo después de la aplicación intranasal (rHu-EPOb 1000 UI) o intravenosa (rHu-EPO, 5000 UI).

Se observó un pico de 430 mUI/mL correspondiente a la rHu-EPO 40 min después de la aplicación, que representa aproximadamente el 0,01 % del total de la dosis inyectada, considerando que el volumen total de LCR de esta especie es de 15 mL aproximadamente. Esta distribución de la rHu-EPO de la sangre al LCR corresponde con lo reportado por otros autores en primates no humanos (10) y humanos (33). Este hallazgo es característico de aquellos componentes de origen proteico que no son permeables a la BHE, pero que en pequeñas cantidades o trazas están presentes en el LCR, como la albúmina (13,15,19). Es de señalar que estas pequeñas cantidades logran concentraciones fisiológicas muy superiores a los niveles basales de rHu-EPO en el LCR garantizando así la acción neuroprotectora ya reportada.

En un estudio realizado por Brines *et al* (8) se demostró que una aplicación de 5000 UI/kg por la vía intraperitoneal en ratones elevaba los niveles de EPO en el LCR a partir de las 3,5 horas de aplicada.

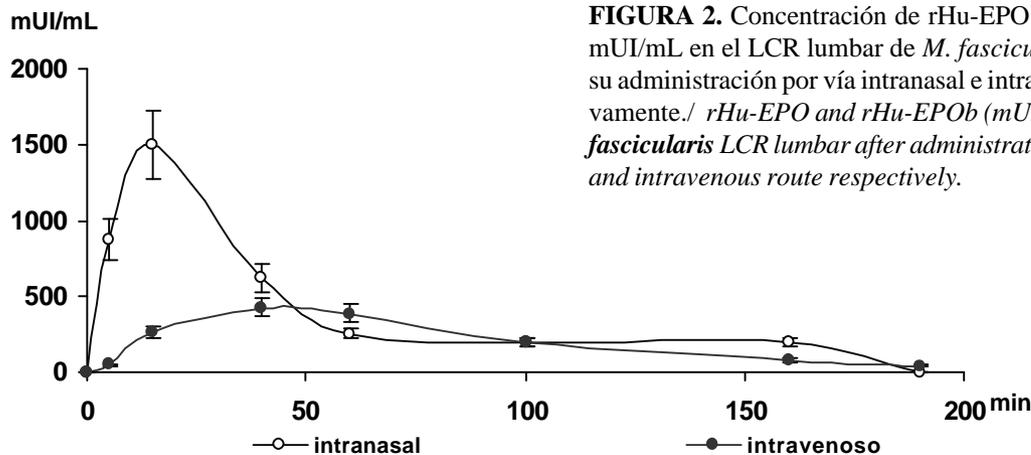


FIGURA 2. Concentración de rHu-EPO y rHu-EPOb en mUI/mL en el LCR lumbar de *M. fascicularis* después de su administración por vía intranasal e intravenosa respectivamente. / *rHu-EPO and rHu-EPOb (mUI/mL) in Macaca fascicularis LCR lumbar after administration by intranasal and intravenous route respectively.*

En el modelo de *M. fascicularis*, a pesar de haberse aplicado 5 veces menos cantidad de rHu-EPO por vía intranasal, se detectaron niveles 3,5 veces mayores de rHu-EPO en el LCR que por la vía intravenosa en un tiempo 4 veces menor. Un análisis de la curva demuestra que pasada la primera hora el comportamiento de ambas vías es muy similar, lo cual sugiere la eliminación rápida de la molécula. De esta manera se pueden evitar posibles efectos secundarios producidos por un exceso de rHu-EPO durante mucho tiempo en el SNC.

La detección de rHu-EPOb marcada con I^{125} en el cerebro después de su aplicación por vía intranasal constituye una fuerte evidencia del paso de la molécula por esta vía. La presencia de la molécula marcada con I^{125} en regiones no relacionadas anatómicamente con la vía olfatoria, como el cerebelo, sugiere la difusión de la misma, a través del líquido intersticial a todo el encéfalo (16). Este hallazgo tiene gran importancia práctica, ya que la rHu-EPOb podría tener acceso al tejido isquémico, lo cual constituye una ventaja cuando se compara con la vía sanguínea.

Las cantidades administradas por vía intranasal en el primate fueron significativamente menores que las endovenosas. Se lograron cantidades de rHu-EPOb suficientes para alcanzar las concentraciones terapéuticas, que parecen ser inferiores cuando se utiliza la vía nasal (38,44), evitándose excesos innecesarios de la molécula tanto en el SNC como en el periférico.

El uso de la vía intranasal para la molécula de rHu-EPOb fue recientemente reportado por Subirós *et al* (39) en la isquemia global transitoria, por Yu *et al.* (44), con rHu-EPO en el modelo de la oclusión de la arteria cerebral media en ratas y Sosa *et al.* (38) en

la isquemia unilateral permanente en el *gerbo de Mongolia*.

Entre las ventajas que se reportan en la aplicación intranasal de rHu-EPOb con respecto a la vía intravenosa está el más rápido y mayor acceso de la molécula al SNC. En la fase aguda del infarto cerebral, uno de los factores críticos para la neuroprotección lo constituye el tiempo que media entre el daño del tejido y la presencia del neuroprotector en el medio dañado. La presencia de EPO en el LCR lumbar en un corto periodo de tiempo es una evidencia de su rápido acceso al SNC (24). En humanos se ha empleado la vía venosa para hacer llegar la molécula al SNC para ejercer su acción terapéutica en casos de infarto cerebral, donde se han obtenido mejorías en los pacientes tratados con rHu-EPO (14).

Resumiendo, la vía intranasal permite el acceso rápido de la molécula de rHu-EPOb al encéfalo, garantizando así sus niveles en cantidades suficientes para ejercer su efecto farmacológico y quedó demostrado en dos especies de animales de laboratorio por métodos diferentes.

REFERENCIAS

- Alafaci, C.; Salpietro, F.; Grasso, G. (2000): Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol.* 406: 219-225.
- Balin, B.J.; Broadwell, R.D.; Salzman, M.; El-Kolling, M. (1986): Avenue for entry of peripherally administered protein in the central nervous system in mouse, rat and squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 251: 260-280.

3. Banks, A.W. (2004): Are the extracellular pathways a conduit for the delivery of therapeutics to the brain? *Current Pharmaceutical Design*. 10: 1365-70.
4. Becerra, S.P.; Amaral, J. (2002): Erythropoietin-an endogenous retinal survival factor. *Engl J Med*. 347: 1968-1970.
5. Bianchi, R.; Buyukakilli, B.; Brines, M. (2004): Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 101: 823-828.
6. Bohlius, J.; Langensiepen, S.; Schwarzer, G. (2005): Recombinant human erythropoietin and overall survival in cancer patients: results of a comprehensive meta-analysis. *J. Natl Cancer Inst.* 97: 489-498.
7. Bolton, E.A. (1985): Radioiodination techniques. *Amersham International Reviews*. 18: 13-17.
8. Brines, M.L.; Ghezzi, P.; Keenan, S. (2000): Erythropoietin crosses the blood brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10526-31.
9. Chang, Y.S.; Mu, D.; Wendland, M. (2005): Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr. Res.* 58: 106-111.
10. Coscarella, A. ; Liddi, R. ; Bach, S. ; Zappitelli, S. ; Urso, R.; Mele, A. ; De Santis, R. (1998) : Pharmacokinetic and immunogenic behavior of three recombinant human GM-CSF-EPO hybrid proteins in cynomolgus monkeys. *Mol. Biotechnol.* Oct; 10(2): 115-22.
11. Degner, D., Meller, J. (2004): Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 9: 42-54.
12. Diem, R.; Sattler, M.B.; Merkler, D. (2005): Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain*. 128: 375-385.
13. Duffy, K.R.; Pardridge, W.M.; Rosenfeld, R.G. (1988): Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metabolism*. 37: 136-40.
14. Ehrenreich, H.; Hasselblatt, M.; Dembowski, C. (2002): Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol. Med.* 8: 495-505.
15. Fantacci, Monica; Bianciardi, Paola; Caretti, Anna; Coleman, T.R.; Cerami, A.; Brines, M.; Samaja, Michele (2006) Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress induced in vivo by severe chronic hypoxia. *PNAS*, November 14, 103(46): 17531-17536.
16. Frey, H.W.; Liu, J.; Chen, X.; Thoner, R.G.; Fawcett, J.R.; Ala, T.A.; Rahman, Y.E. (2004): Delivery of ¹²⁵I-NGF to the brain via the olfactory route. *Drug Delivery*. 1997; 4: 87-92.
17. García Salman, J.D. (2004): Protección neuronal endógena: un enfoque alternativo. *Rev. Neurol.* 38(2): 150-155.
18. Genc, S.; Koroglu, T.F.; Genc, K. (2004): Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.* 1000(1-2): 19-31.
19. Golden, P.L.; Maccagnan, T.J.; Pardridge, W.M. (1997): Human blood-brain barrier leptin receptor: binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J. Clin. Invest.* 99: 14-8.
20. Gorio, A.; Gokmen, N.; Erbayraktar, S. (2002): Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 9450-9455.
21. Graff, C.L.; Pollack, G.M. (2005): Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharm Sci.* 94: 1187-1195.
22. Gross, E.A.; Swenberg, J.A.; Fields, S.; Popp, L.A. (1982): Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J. Anat.* 135(pt.1), 83.
23. Hilger, P.A. (1989): Applied anatomy and physiology of the nose. In *Boies Fundamentals of Otolaryngology*, 6th ed., ed. G.L Adams, L.R. Boies, and P.A Hilger, Philadelphia: W.B. Saunders. 177-195.
24. Illum, L. (2003): Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *J Control Release*. 87: 187-198.
25. Jelkmann, W. (2004): Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med*. 43: 649-659.
26. Kumral, A.; Gonenc, S.; Acikgoz, O. (2005): Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*. 87: 15-18.

27. Lappin, T.R.; Maxwell, A.P. and Johnston, P.G. (2002): EPO's Alter Ego: Erythropoietin Has Multiple Actions. *Stem Cells* 20: 485-492.
28. Li, W.; Maeda, Y.; Yuan, R.R. (2004): Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis. *Ann Neurol.* 56: 767-777.
29. Li, Y.; Cui, Y. (2005): Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Res.* 1034: 34-39.
30. Lipšic, Erik; Schoemaker, Regien G.; van der Meer, Peter; Voors Adriaan, A.J., van Veldhuisen, Dirk; van Gilst Wiek, H. (2006): Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. Chapter 8.
31. Lu, D.; Mahmood, A.; Qu, C. (2005): Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 22: 1011-1017.
32. Masuda, S.; Okano, M.; Yamagishi, K.; Nagao, M.; Ueda, M.; Sasaki, R. (1994): A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 19488-19493.
33. Olsen, N.V. (2003): Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin. *Clin Infect Dis.* 37 (Suppl 4), S323.
34. Powell, J.S. (1986): Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6465-6469.
35. Sakane, T.; Akizuki, M.; Yoshida, M.; Yamashita, S.; Nadai, T.; Hashida, M. and Sezaki, H. (2000): Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 449-451.
36. Sattler, M.B.; Merkler, D.; Maier, K. (2004): Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death.* 11(Suppl 2): S181-S192.
37. Sinn, D.; Chu, K.; Lee, S. (2005): Erythropoietin has neuroprotective effects with functional recovery in experimental intracerebral hemorrhage. 57th Annual Meeting of the American Academy of Neurology.; S48.008: <http://www.abstracts2view.com/aan/>
38. Sosa, T.I.; García Rodríguez, J.C.; García Salman, J.D.; Santana, J.; Subirós, M.N.; González, T.C.; Rodríguez, C.Y. (2006): Intranasal administration of recombinant human erythropoietin exerts neuroprotective effects on post-ischemic brain injury in Mongolian gerbils. *Pharmacologyonline* 1: 100-112.
39. Subiros, M.N.; García Rodríguez, J.C.; González, N.B.; Sosa, T.I.; García Salman, J.D. (2005): Evaluación histológica del efecto de la Eritropoyetina nasal sobre la muerte neuronal retardada en gerbos sometidos a isquemia cerebral transitoria. Estudio preliminar. Séptimo Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía patológica y Primer Congreso de preparaciones virtuales por INTERNET, (http://www.conganat.org/7congreso/final/vista_trabajo=445.pdf) La Habana, Octubre.
40. Thorne, R.G.; Emory, C.R.; Ala, T.A.; Frey, W.H. (1995): Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.* Sep 186 92(1-2):278-82.
41. van der Meer, Peter; Voors Adriaan, A.; Lipsic, Erik; van Gilst Wiek, H.; van Veldhuisen Dirk, J. (2005): Erythropoietin in cardiovascular diseases. *European Heart Journal.* 25(4): 285-291.
42. Wang, X.; Zhu, C.; Wang, X.; Gerwien, J.G.; Schrattenholz, A.; Sandberg, M.; Leist, M.; Blomgren, K. (2004): The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J. Neurochem.* 91: 900-910.
43. Yatsiv, I.; Grigoriadis, N.; Simeonidou, C. (2005): Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *Faseb J.* 27(2): 179-186.
44. Yu, Y.P.; Xu, Q.Q.; Zhang, Q.; Zhang, W.P.; Zhang, L.H.; Wei, E.Q. (2005): Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* Oct 14; 387(1): 5-10.

(Recibido 2-2-2007; Aceptado 15-4-2007)