

EPOhr: FARMACOCINÉTICA, FARMACODINAMIA Y BIODISTRIBUCIÓN EN CONEJOS NUEVA ZELANDA

Gledys Reynaldo¹, Yamila Colon², Yisel Martínez², María de los A. Becquer³, Joaquín Zolasabal⁴, Mabel Respall², Madelin Cruz², Eduardo Fernández-Sánchez³

¹ Departamento de Farmacología y Toxicología, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.

² Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.

³ Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.

⁴ Centro de Inmunología Molecular.

A quién dirigir correspondencia:

Dr.C. Eduardo Fernández-Sánchez. Jefe del Laboratorio de Farmacocinética, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. Email: efernandez@ifal.uh.cu

Resumen

La eritropoyetina humano recombinante es una glicoproteína natural y es obtenida por técnicas humano recombinantes. Constituye la estructura base del biosimilar EPOCIM[®] actualmente en la práctica clínica nacional e internacional. Es un medicamento de excelencia en el tratamiento de la anemia y se le atribuyen otras propiedades citoprotectoras en cerebro y corazón. Dado que en la literatura no se reporta una caracterización experimental del EPOCIM[®], el presente trabajo permite una caracterización integral desde el punto de vista farmacológico. Se determina en conejos Nueva Zelanda, los parámetros farmacocinéticos resultantes de aplicar el Análisis No Compartimental, la evaluación Farmacodinámica de índices hematológicos y el patrón de Biodistribución por marcaje isotópico. Los resultados coinciden con lo reportado para la epohr por otros autores y correlacionan con los novedosos efectos terapéuticos investigados en la clínica.

Palabras Clave: Eritropoyetina humano recombinante (epohr), farmacodinamia, efecto integral, marcaje isotópico, biodistribución.

EPOhr: PHARMACOKINETICS, PHARMACODYNAMICS AND BIODISTRIBUTION IN NEW ZELAND RABBITS

Abstract

Human recombinant erythropoietin is an endogenous glycoprotein which is obtained industrially by human recombinant techniques. This molecule constitutes the basis of the biosimilar EPOCIM[®] with wide introduction to the clinical practice, national and international. This biotechnological product is of excellence in the treatment of the anemia, with attribution of cytoprotection in brain and heart, now

researching in the clinical practice. Due that doesn't exists in the literature reports of experimental characterization, the aim of this paper is to offer an integral pharmacological evaluation on EPOCIM®. The experimental model was the New Zealand rabbit. It shows the pharmacokinetic parameters employing the Non Compartmental Analysis, the pharmacodynamic evaluation of hematological indexes and the Biodistribution employing isotopic labeling of the molecule. There is a coincidence with the reported for epoehr by different authors and it established a correlation with the novel therapeutic effects attributed in the clinical research now on its way.

Key words: Recombinate erythropoietin (epohr), pharmacodynamics, integral effect, isotopic labeling, biodistribution.

Introducción

Una de las proteínas terapéuticas más utilizadas es la Eritropoyetina, con ventas superiores a los 1500 millones de USD mundialmente. La EPO humana, aislada en 1977 ¹ a partir de grandes cantidades de orina de pacientes con anemia aplásica es una hormona sialoglicoproteica con un peso molecular de 34 kda. La eritropoyetina humana recombinante (epohr) se produce a partir del aislamiento del gen humano y su expresión en líneas celulares de ovario de Hamster Chino ². Este producto recombinante es estructuralmente muy similar e inmunológicamente equivalente a la hormona natural ^{3, 4}. La epoehr estimula la producción de células rojas en la médula ósea ^{5, 6, 7}. El hígado constituye otra fuente productora de EPO pero en menor cantidad con una producción de 10 a 20% del total.

El mecanismo de acción de la EPO comienza con la unión a su receptor (EPO-R), el cual se encuentra expresado en la superficie celular de eritrocitos ^{8, 9, 10, 11}. En su forma inactiva el receptor se encuentra como monómero. Al unirse la molécula de eritropoyetina se produce la dimerización del receptor pasando a su forma activa y desencadenando una cascada de señales intracelulares mediante fosforilaciones de diversas proteínas, cuyo fin es bloquear las señales de apoptosis de la célula y aumentar el tiempo de vida media de las mismas. Este constituye el efecto primario de la hormona. El receptor de EPO también se expresa en células de la médula ósea, donde estimula la producción de células precursoras de los eritrocitos, en linfocitos y células del sistema nervioso central y periférico, después de la hipoxia ^{12, 13}. El efecto farmacodinámico secuencial de la epoehr es reportado en el 2008 ¹¹, señalando un efecto transientes con la desaparición de los niveles sanguíneos de epoehr y dando lugar el primer paso del mecanismo con la inducción de los niveles de reticulocitos y posteriormente el punto final farmacológico con la formación de hemoglobina. En este sentido otros investigadores reportaron que la epoehr podía atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE) y que su paso se incrementaba en condiciones de daño neuronal ^{14, 15}. Aunque la BHE es

considerada impermeable a moléculas grandes, existen estudios que demuestran claramente que algunas moléculas de alto peso molecular pueden ser transportadas hacia el cerebro a través del endotelio capilar, encontrándose 2 tipos de receptores de EPO diferentes en el endotelio capilar cerebral. Es por ello, ha sido sugerido que la EPO circulante se une a estos receptores, iniciándose la endocitosis seguida de la translocación hacia el cerebro.

La causa principal de la anemia asociada a la Insuficiencia Renal Crónica (IRC) es la producción inadecuada de eritropoyetina por el riñón, de modo que aunque los niveles séricos de esta hormona son similares a los de la población general, están desproporcionadamente bajos para el nivel de hemoglobina que presentan. El tratamiento disponible para la misma consistía en frecuentes transfusiones de sangre que deterioraban de forma significativa la calidad de vida de éstos pacientes, además de exponerles a riesgo de contagio de infecciones virales. Sin embargo en 1986 se utilizó por primera vez la epoeh en pacientes en hemodiálisis; se amplió la experiencia a partir de 1989 cuando se pudo disponer en proporciones industriales, con claros beneficios para los enfermos^{16, 17} reduciéndose así la necesidad de las transfusiones y aumentando el bienestar de los pacientes constituyendo un tratamiento bien aceptado por los mismos. Así quedó recogido en las guías de práctica clínica para el tratamiento de la anemia en pacientes con IRC en diálisis publicada en 1999¹⁸.

Actualmente, la epoeh es el tratamiento estándar para las anemias de origen renal (falla renal crónica y aguda) y algunas de origen no renal como por ejemplo las anemias asociadas a cáncer, hemoglobinopatías, mieloma, síndromes mielodisplásicos, aplasia, enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide), terapia con Zidovudina en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y en otras enfermedades críticas como es el fallo cardiaco^{19, 20, 21}. En este sentido se ha logrado un amplio uso clínico con este producto^{22, 23, 24, 25, 26, 27, 28}.

Otras aplicaciones clínicas están siendo desarrolladas en paralelo de acuerdo a los últimos hallazgos a nivel de los mecanismos de acción no hematopoyéticos. La naturaleza de las acciones neuroprotectoras de la EPO ha sido evaluada tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", demostrándose que la misma puede ser usada en el tratamiento de enfermedades cerebrales^{29, 30, 31, 32, 33, 34}. Actuando de manera antiapoptótica, antioxidativa, anti-inflamatoria, neurotrófica, angiogenética e inhibiendo el glutamato.

En Cuba, desde el año 1996 la EPOCIM[®] es el producto biosimilar de la Eritropoyetina humana recombinante, siendo este considerado el producto líder de este centro en las exportaciones a varios países. Desde entonces EPOCIM[®] ha sido ampliamente utilizado en la práctica clínica nacional

El presente trabajo se encamina dado que no existen en la literatura datos reportados sobre su caracterización farmacocinética y farmacológica, determinar sus valores característicos a fin de ser empleados en cuanto al desarrollo inherente a un producto que deriva hacia otras aplicaciones y a variantes tecnológicas para incrementar su eficacia.

Materiales y Métodos

Producto ensayado:

Formulación comercial de eritropoyetina humano recombinante EPOCIM[®] de la firma CIMAB S.A, .El producto en solución homogénea fue envasado en bulbos estériles a la concentración de 4 000 UI en 1 ml. El lote empleado fue liberado manifestando esterilidad y pirógenos de la solución de acuerdo a la USP XXII

Ensayo farmacocinético::

Para el estudio se utilizó una especie de conejos Nueva Zelandia, machos procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de La Habana, los cuales tenían su correspondiente certificado de salud.

Todos los animales fueron alimentados con pienso vitaminado, procedente del CENPALAB, el cual reporta su correspondiente certificado de calidad. La adaptación de los animales fue de 37 días. Los animales fueron mantenidos en ayuna desde la noche anterior, posibilitándose la toma de agua. La administración del agua y la comida fue *ad libitum*, posterior a las 2 horas de la administración del producto. Durante el experimento el ciclo de luz/oscuridad fue de 12 x 12 horas, las condiciones de temperatura ambiental, 19.5 °c, y de humedad relativa ambiental 71 %.

Para su manipulación durante el experimento, los animales fueron anestesiados y colocados en cepos. Los animales fueron tratados preservando las normas éticas para la manipulación de animales, de acuerdo a las normativas del *International Animal Care Committee*, en correspondencia a las *Guidelines for Animal Experiments* de la Unión Europea ³⁵.

Modo de administración::

Se aplicó la dosis bolus intravenoso por la vena marginal de la oreja del animal, mediante venipuntura utilizando jeringuillas esterilizadas de 1 ml, con agujas de calibre 30G. Se utilizaron grupos de animales de n=5, tomados aleatoriamente. Cada grupo de animales recibió una dosis bolus i.v. De EPOCIM de 10 mcg/Kg. La dosis fue establecida de acuerdo a la conversión de 1 mcg = 100 UI, en correspondencia a las unidades de cuantificación utilizadas para las concentraciones por tiempo en mui/ml. Posterior a la administración se tomaron muestras sanguíneas, por la vena marginal de la otra oreja a los tiempos de 0, 30 min, 1,3,6, 8, 16, 24, 36, 48, 72 y 96 horas. El peso de los animales se encontró dentro del rango de 2.0-2.2 Kg, para un peso promedio de 2.16 +/- 0.08 Kg.

Procesamiento de los muestras:

Las muestras se dejaron 1 hora en reposo hasta la retracción espontánea del coágulo, despegando éste del borde del vial por fricción mecánica con tubo capilar de vidrio, y centrifugándose a 3000 r.p.m. Durante 15 min., posteriormente se extrajo el suero sobrenadante, y las muestras fueron refrigeradas a -20°C , hasta la posterior cuantificación.

Método de cuantificación ELISA:

Se utilizó el kit comercial EPO ELISA, de la firma Roche Diagnostics GMBH, Roche Applied Science, 68298 Mannheim, Alemania; de número de catalogo 11 693 417 001.

Procesamiento matemático y estadístico de los resultados:

Se trabajó con los datos primarios brutos. Para cada animal, para su relación de concentración vs. Tiempo, se le establecen los perfiles farmacocinéticos, y se calcularon los parámetros farmacocinéticos mediante un análisis no compartimental, mediante la programateca de procesamiento farmacocinético WINNONLIN[®] Pro V. 2.1³⁶. Se determinó la media y la desviación estándar de los parámetros calculados.

Se calcularon los siguientes parámetros característicos, de acuerdo a lo reportado en la literatura especializada^{37, 38}:

λ : Constante de la fase de eliminación.

$T_{1/2\lambda}$: Tiempo de vida media de eliminación

AUC: Area bajo la curva

C_{max} : Concentración máxima obtenida

MRT: Tiempo medio de residencia

Vss: Volumen de distribución en el estado estacionario

CL: Aclaramiento

CL/kg: Aclaramiento corregido por el peso corporal del animal

Vss/kg: Coeficiente de distribución en el estado estacionario.

Ensayo Farmacodinámico:

Animales: Se utilizó una especie de conejos Nueva Zelanda (NZ) machos, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de La Habana, los cuales tenían su correspondiente certificado de salud. Se procedió según las normativas establecidas para el trabajo con animales, en el Bioterio del Instituto Nacional de Oncología y Radiología (INOR), y en correspondencia con los PNO para estudios de Farmacodinamia en Conejos, establecidas por la Unidad de Garantía de la Calidad del Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos.

Todos los animales fueron alimentados con pienso vitaminado, procedente del Centro Nacional para Animales de Laboratorio (CENPALAB), el cual reporta su correspondiente Certificado de Calidad. La adaptación de los animales fue de 30 días. Los animales fueron mantenidos en ayuna desde la noche anterior al experimento, posibilitándose la toma de agua.

El peso de los animales (n=5) estuvo comprendido entre 1.8 – 2.0 Kg, para un peso promedio de 1.84 +/- 0.09 kg. Todos fueron alimentados con pienso completo de mantenimiento, procedente del CENPALAB, el cual reporta su correspondiente certificado de calidad. La adaptación de los animales fue de 37 días. Desde la noche anterior al comienzo del estudio, fueron mantenidos en ayunas hasta el momento de la administración del producto. Después de este momento, se les permitió la toma de agua y comida *ad libitum*. Durante el experimento el ciclo de luz / oscuridad fue de 12 x 12 horas, la temperatura ambiental se mantuvo alrededor de un valor constante de 19.5 °c, y la humedad relativa, alrededor del 71 %.

Para su manipulación durante el experimento, los animales fueron colocados en cepos, y tratados preservando las normas éticas para la manipulación de animales, de acuerdo a las normativas del *International Animal Care Committee*, en correspondencia a las *Guidelines for Animal Experiments* de la Unión Europea ³⁵.

Variables farmacodinámicas:

Se definieron las siguientes variables a medir, en relación a su mecanismo farmacológico ¹¹:

- Evolución Temporal del conteo de reticulocitos
- Evolución Temporal de los niveles de hemoglobina

Modo de administración y colección de muestras: Se escogió una población de 5 conejos machos Nueva Zelanda, se les aplicó una dosis de EPOCIM[®] de 10 mcg/Kg bolus intravenoso por la vena marginal de la oreja del animal, mediante venipuntura utilizando jeringuillas esterilizadas de 1 ml, con agujas de calibre 30G. Posterior a la administración, para la determinación de las variables hematológicas (conteo de reticulocitos y hematíes, niveles de hemoglobina) los tiempos establecidos de muestreo fueron : 0, 21, 36 y 42 días.. Las muestras se colectaron a un volumen de 1.0 ml/muestra en tubos eppendorf con 10 µl de EDTA al 10% como anticoagulante.

Cuantificación de las muestras:

Para las determinaciones de los parámetros hematológicos (reticulocitos y hemoglobina) se emplearon los siguientes procedimientos:

Se utilizó el equipo automático PENTRA 120, para la determinación de hematíes y el conteo de reticulocitos se realizó manualmente a través de procedimientos estándares de laboratorio los cuales se describen a continuación:

Se mezcló una gota de sangre fresca venosa anticoagulada con iguales cantidades de colorante (azul brillante de cresilo) en un tubo de 12 x 75. Luego se incubó a 37°C durante 20 min. Se realizó frotis en una lámina portaobjeto y una vez seca, se llevó a cabo el conteo de reticulocitos. Este último se realizó cuantificando los reticulocitos presentes en 10 campos que poseían aproximadamente 100 hematíes cada uno y se informó directamente. En el caso de los valores bajos se contaron los reticulocitos presentes en 20 campos dividiendo el resultado entre 2 y luego se informó. Las correcciones elaboradas no alteran el hecho de que hay considerable error ($\pm 2\%$ en recuentos bajos; hasta $\pm 7\%$ en recuentos altos) y falta de reproducibilidad inherente al recuento de reticulocitos. La hemoglobina se cuantificó por método espectrofotométrico por reactivo de Drabkin, mediante el PNO del Laboratorio Clínico del INOR.

Análisis farmacodinámico: Los valores primarios de efecto, E, (reticulocitos y hemoglobina) fueron representados directamente como una función de E vs. T., para evaluar el transcurso de la respuesta farmacodinámica.

Análisis estadístico:

Se establecieron perfiles individuales (Efecto vs. Tiempo) de las variables hematológicas para cada conejo en estudio y de sus valores medios (media \pm DE). Para las determinaciones farmacodinámicas a cada intervalo de tiempo se utilizó procedimiento estadístico utilizando una prueba de T de Student con un nivel de significación de $\alpha=0.05$ para variables independientes. Para esto se utilizó el Software ³⁹. Se adoptó el criterio de cada sujeto como su control, tomando como valor de comparación el basal de cada variable.

Ensayo de Biodistribución:

Marcaje y control de calidad: La molécula fue marcada con ¹³¹I- a través del método de la Cloramina-T. Los isótopos de yodo fueron suministrados por el Centro de Isótopos (La Habana, Cuba), de donde se obtienen en forma de Na¹³¹I, libres de portador y en solución de Hidróxido de Sodio 0,1 mol/L, pH 8-10. Brevemente, la cantidad seleccionada de proteína (20 μ g) disuelta en 50 μ l de PBS fue transferida a un vial de reacción eppendorf. Posteriormente se le adiciona 8 mci de ¹³¹I (nai). Se adicionaron 30 μ l de una solución fresca de Cloramina-T de concentración 24 mg/ml en PBS pH 7. Se agita la mezcla durante un breve período de 2 minutos y se detiene por adición de una solución de 30 μ l Metabisulfito de Sodio (48 mg/ml de PBS). La pureza radioquímica de los preparados se determinaron mediante cromatografía ascendente en papel, usando como fase estacionaria papel cromatográfico Whatmann 3 MM y solución salina fisiológica 0,9 % como fase móvil.

Características del ensayo:

El ensayo se realizó en ratones Balb/c sanos, de peso promedio de 19 +/- 0.2 g. Luego de la administración de ¹³¹I-EPOCIM correspondiente a una dosis de 10 µg/kg de peso corporal, los animales en grupo de tres fueron sacrificados por dislocación de la espina dorsal en los tiempos seleccionados: 10, 0.33, 20 min, 1, 3, 5, 8, 12, 18, 24, 48 h. Se colectaron muestras de sangre y órganos mayores; las que fueron pesadas en una balanza analítica y medidas para la determinación de la actividad en un contador de pozo de centelleo sólido de nai(Tl). Se determinó el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido, %DI/g.

Resultados

Farmacocinética:

En la figura 1 se representan los transcurros farmacocinéticos de datos primarios obtenidos para cada uno de los conejos, pudiéndose observar que los valores de concentración en todos los animales tratados descienden con un transcurso lógico a manera que el tiempo va aumentando, lo cual guarda una correspondencia con la vía de administración utilizada. Se aprecia que las variaciones intersujetos son inapreciables.

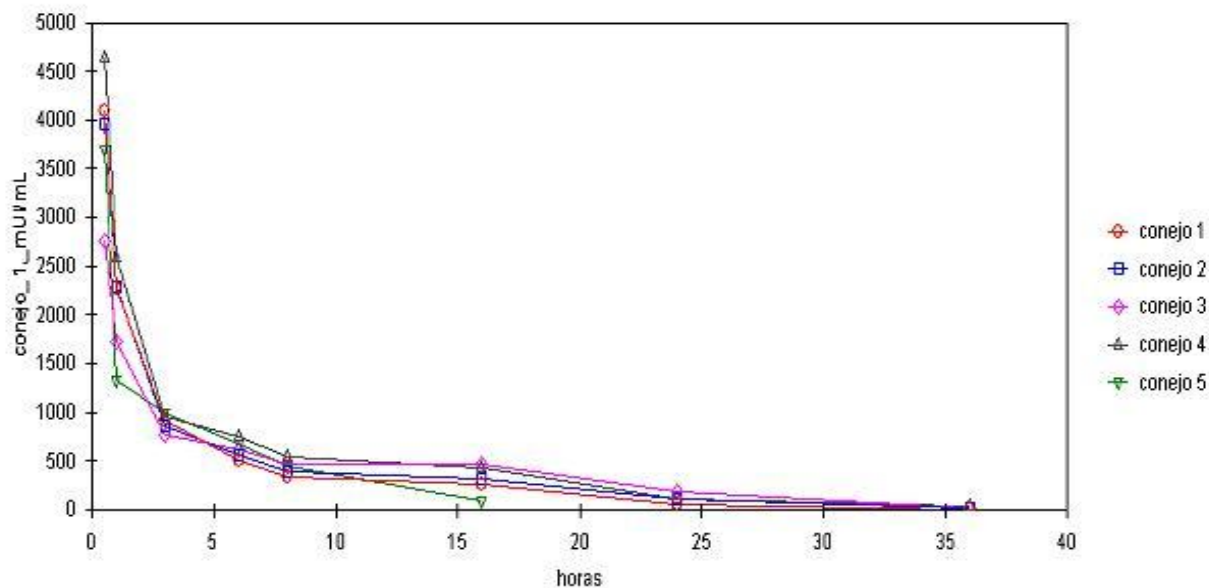


Figura 1. Perfiles superpuestos de datos primarios de los 5 conejos. EPOCIM®, administración bolus IV., dosis 10 mcg/ml

En la tabla 1, se reportan los parámetros farmacocinéticos calculados para cada animal mediante el análisis no compartimental, posterior a la administración de EPOCIM, expresando los valores de su promedio y desviación estándar.

Tabla 1. Parámetros Farmacocinéticos de la EPOCIM, en conejos Nueva Zelanda. Administración bolus i.v., dosis 10 mcg/Kg. Análisis NCA.

Parámetro	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	Media +/- D.E.
Cmax. Mui/ml	7366.45	6889.38	4422.40	8330.53	10355.74	7472.90 +/- 2162.387
T ½, h	3.36	5.67	5.41	6.21	3.66	4.86 +/- 1.27
AUC, UI/ml·h	14.58	15.94	16.18	19.47	13.27	15.89 +/- 2.31
MRT, h	5.48	6.99	9.22	7.34	4.05	6.62 +/- 1.95
CL/Kg, ml/h·Kg	68.55	62.72	61.77	51.34	75.31	63.94 +/- 8.88
Vss/Kg, L/Kg	0.37	0.43	0.56	0.37	0.30	0.41 +/- 0.09

Farmacodinamia:

En la figura 2, se representan los transcurso primarios con los valores promedios (para n=5) en función de días de tratamiento, donde se observa mas explícitamente el transcurso de los valores de reticulocitos después de la administración de una dosis única de EPOCIM®. Las desviaciones obtenidas para cada tiempo son bajas en relación a este tipo de experimento.

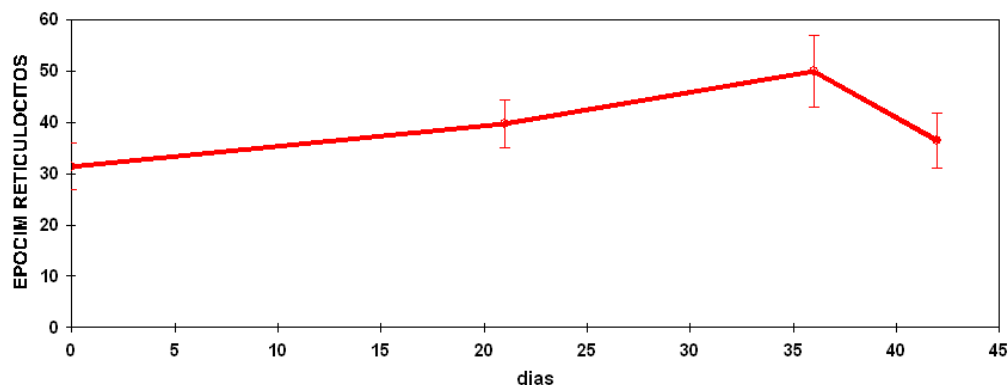


Figura 2. Evolución temporal de los valores promedios en días del conteo de reticulocitos tras la administración de la EPOCIM®, administración bolus i.v., a dosis de 10 mcg/kg, en conejos Nueva Zelanda.

Más explícitamente en la figura 3 se demuestra que a los 42 días, los valores obtenidos (no desviación significativa) los conteos de reticulocitos retornan al valor basal de los conejos, indicando que ya alrededor de los 36 días ya cesa un efecto farmacodinámico notable. Se prueba que la diferencia a los 36 días respecto al valor basal es significativa para un valor de $p < 0.001$, y posteriormente a los 42 días manifiesta un valor no significativo de $p < 0.152$.

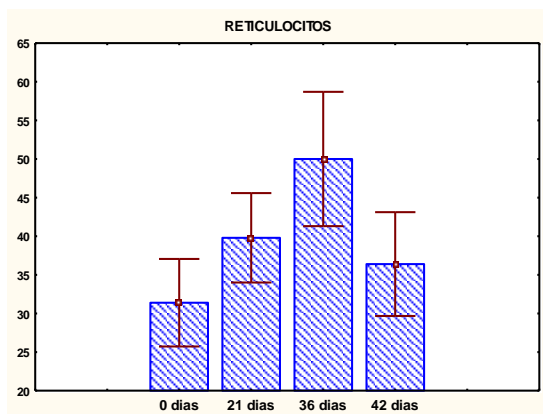


Figura 3. Representación en barras de la evolución temporal de los valores promedios en días del conteo de reticulocitos tras la administración de la EPOCIM®.

En la figura 4, se representan los transcurso primarios con los valores promedios para hemoglobina (para $n=5$) en función de días de tratamiento, donde se observa más explícitamente el transcurso de los valores de hemoglobina después de la administración de la EPOCIM®. Las desviaciones obtenidas para cada tiempo son bajas en relación a este tipo de experimento.

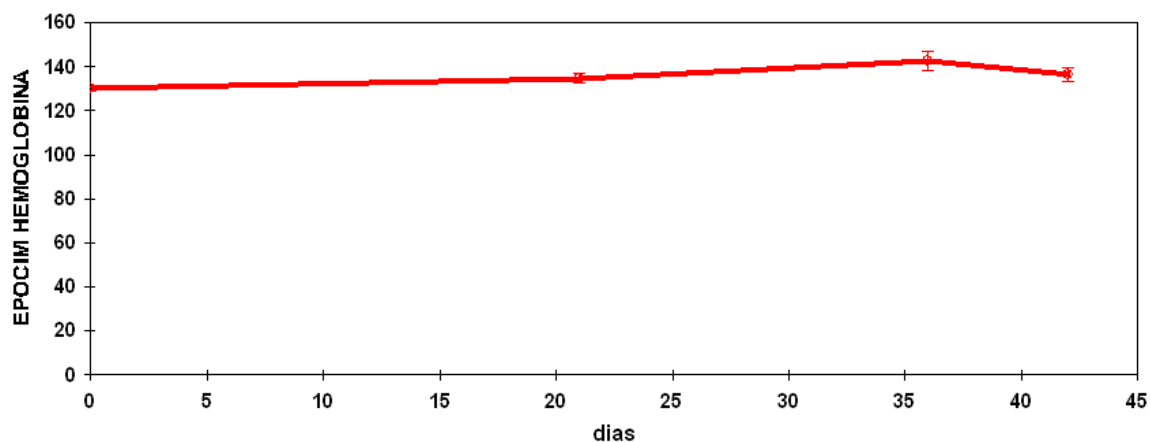


Figura 4. Evolución temporal promedios ($n=5$) en días del nivel de Hemoglobina tras la administración de la EPOCIM®, administración bolus i.v., a dosis de 10 mcg/kg, en conejos Nueva Zelanda.

En la figura 5 se puede observar esta variación en el transcurso, donde se hace evidente que aun a los 42 días aunque la tendencia existe, no se vuelve a los valores basales de hemoglobina. No obstante solamente existen diferencias significativas para el tiempo de 36 días ($p < 0.041$) y a los propios 42 días no existen diferencias con el valor basal ($p < 0.366$).

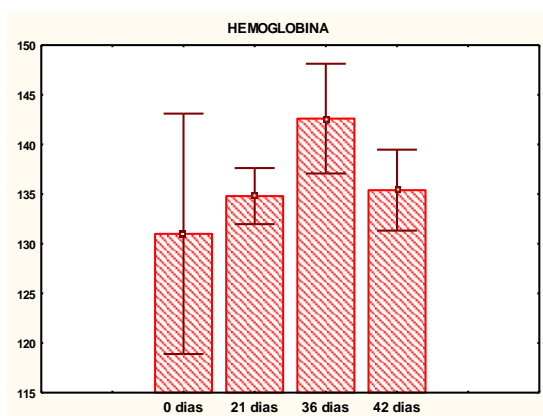


Figura 5. Representación en barras de la evolución temporal de los valores promedios en días del nivel de hemoglobina tras la administración de la EPOCIM®.

Biodistribución:

En la tabla 2, se representan los valores de captación por órganos seleccionados, indicando las mayores captaciones hasta las 24 h en todos los órganos excepto en cerebro y médula.

Órganos	10 min	1h	5h	8h	12h	18h	24h	48h
Hígado	0.14	0.27	0.30	0.33	0.39	0.34	0.22	0.10
Bazo	0.44	0.82	0.97	0.78	1.19	1.08	0.70	0.24
Riñones	1.18	1.29	1.08	0.75	1.48	1.31	1.12	0.33
Corazón	0.16	0.31	0.47	0.76	0.44	0.34	0.31	0.18
Pulmón	0.25	0.35	0.28	0.39	0.52	0.75	1.27	0.18
Médula	0.45	0.32	0.29	0.17	0.14	0.10	0.10	0.04
Cerebro	0.21	0.12	0.11	0.09	0.07	0.06	0.05	0.03
Músculo	0.49	0.55	0.64	0.75	0.69	0.96	0.75	0.27
Hueso	1.33	1.20	1.46	1.45	1.21	0.97	0.91	0.35

Discusión

El análisis farmacocinético presenta como puntos relevantes que el $t_{1/2}$ de la EPOCIM es de 4.86 +/- 1.27 h, valor cercano a lo reportado en el humano, y en concordancia a lo manifiesto para las proteínas terapéuticas. Su volumen de distribución, refleja un valor de 0.41 +/- 0.09 L/kg, valor alto

anatómicamente en referencia al torrente sanguíneo para indicar la alta interiorización de la molécula lo cual garantiza el poder establecer un efecto farmacológico respecto a los órganos diana, estos resultados se corresponden a otros valores reportados en la literatura ^{40, 41}. El transcurso farmacodinámico correspondiente a reticulocitos y hemoglobina, indican que soportan el mecanismo farmacodinámico propuesto y el efecto terapéutico a buscado ^{11, 16, 17}, efecto este que para ambos indicadores va en ascenso hasta las 36 horas donde comienza a desaparecer el efecto.

Lo valores de Biodistribución en la tabla II indican que a pesar de ser una proteína donde no se esperaban altas captaciones, si es de señalar que en las primeras 5 horas se alcanza una notable captación a médula biofase primaria para efectuar su mecanismo hematopoyético, y en hígado, corazón y cerebro se obtienen altos valores, los cuales se asocian a los efectos citoprotectores actualmente investigándose ^{12, 14, 27, 29, 32, 33, 34}.

Literatura citada

- ¹ Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. J Biol Chem 1977;252:5558-64.
- ² Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. J Biol Chem 1977;252:5558-64.
- ³ Wiczorek L, Hirth P, Schope KB, Scigalla P, Kruger D. Molecular biology of Erythropoietin. Innovative aspeckte der klinischen medizinen. Spriger-Verlag, Berlin, Germany. Hrsg. Gurland 1990;55-70.
- ⁴ Scrips Citokines Report. Ed PJB publications. 1993;237-268.
- ⁵ Erslev A: Humoral regulation of red cell production. Blood 1953;8:349-357.
- ⁶ Jelkmann W. Erythropoietin: Structure, control of production and funtion. Physiological rewies. April 1992;72(2).
- ⁷ Jelkmann W. Recombinant EPO production—Points the nephrologist should know. Nephrol Dial Transplant 2007;22:2749-2753.
- ⁸ Fisher, J.W. Erythropoietin: Pharmacology, Biogenesis and Control of Production. Pharmacol. Rev 1972;24:459-508.
- ⁹ Goldwasser E, Watson, J., Fox, C.F. (Eds). Control of Cellular Division and Development. Alan R. Liss, N.Y.1981;147.
- ¹⁰ Rossert J, Eckardt K-U: Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. Nephrol Dial Transplant 2005;20:1025-1028.
- ¹¹ Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: A common mechanism of action. Exp Hematol. 2008 Dec;36(12):1573-84.

-
- ¹² Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001;21:9733-9743.
- ¹³ Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(4):386-92.
- ¹⁴ Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C et al. From the cover: erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;19:10526-31.
- ¹⁵ Xenocostas A, Cheung WK, Farrell F, Zakszewski C, Kelley M, Lutynski A, Crump M, Lipton JH, Kiss TL, Lau CY, Messner HA. The pharmacokinetics of erythropoietin in the cerebrospinal fluid after intravenous administration of recombinant human erythropoietin. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:189–195.
- ¹⁶ Sánchez CA, Barrau J, Gómez Alamillo C, Jaurrieta F. Anemia y eritropoyetina. *Nefrología* 1989;9:342-3.
- ¹⁷ Sánchez CA, Barrau J, Gómez C, Jaurrieta F. Respuesta inicial al tratamiento con eritropoyetina en la anemia de la insuficiencia renal crónica. *Sangre* 1990;35:82-4.
- ¹⁸ Cameron JS. European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure (EBPG). *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(suppl 2):61-65.
- ¹⁹ Marsden JT. Erythropoietin measurement and clinical applications. *Ann.Clin.Biochem.* 2006;43,97-104.
- ²⁰ Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Djulbegovic B, et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst.* 2006 May 17;98(10):708-14.
- ²¹ Jelkmann W. Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents. *Br J Haematol.* 2008 May;141(3):287-97.
- ²² Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 1986;2:1175-8.
- ²³ Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of combined phase I and II trials. *N Engl J Med* 1987; 316:73-74

-
- ²⁴ Eschbach JW, Nelly MR, Haley NR, Abels RI, Adamson JW. Treatment of the anemia of progressive renal failure with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1989; 321: 158-163
- ²⁵ Jelkmann W. Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Curr Pharm Biotechnol* 2000;1:11–31
- ²⁶ Ajay K. Singh, Szczech L, Kezhen L. Tang, Huiman Barnhart, Shelly Sapp, Marsha Wolfson, and Donal Reddan, for the CHOIR Investigators. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006;355:2085-2098
- ²⁷ Santilli G, Tarantini L, Baio P, Senni M. Diagnosis and treatment of anemia in heart failure patients]. *G Ital Cardiol (Rome)*. 2011 May;12(5):319-26. Doi:10.1714/643.7496
- ²⁸ Kotecha D, Ngo K, Walters JA, Manzano L, Palazzuoli A, Flather MD. Erythropoietin as a treatment of anemia in heart failure: systematic review of randomized trials. *Am Heart J*. 2011 May;161(5):822-831.
- ²⁹ Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000;401: 349-356.
- ³⁰ Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M et al. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clinical Science* 2002;103:275-282.
- ³¹ Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M et al. Erythropoietin Therapy for Acute Stroke Is Both Safe and Beneficial. *Molecular Medicine* 2002; 8(8): 495–505
- ³² Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M, Sirén AL. Erythropoietin: Novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metabolic Brain Disease* Dec 2004; 19(3/4):195-206.
- ³³ Ehrenreich H and Bartels C. From bench to bedside: Neuroprotective effects of erythropoietin. *Recombinant Human Erythropoietin (rhepo) in Clinical Oncology* 2008;771-792, DOI:10.1007/978-3-211-69459-6_32.
- ³⁴ Grasso G, Sfacteria A, Cerami A, Brines M. Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go? *The Neuroscientist* 2004;10(2):93-98.
- ³⁵ EMEA. Guidelines for Animal Experiments of the European Union. (ARCA No. 012/2000. 2000).
- ³⁶ WINNONLIN, Pro.V2.1. Copyright Pharmasight Corporation 1998.
- ³⁷ Yamaoto, K., Nakagawa, T. Y Uno, T. Staisitcal moments in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm* 1978;6:547-588.
- ³⁸ Gibaldi M y Perrier D. “Pharmacokinetics”. Marcel Dekker Inc. New York 2007.
- ³⁹ STATISTICA, versión 6.1 statsoft, Inc. 2003.

⁴⁰ Veng-Pedersen R.et al. Kinetic Evaluation of Nonlinear Drug Eliminaation by a Disposition descompositionanalysis. Application to the Analysis fo the Nonlinear Elimination Kinetics of Erythropoietin in Adult Humans. Journal of Pharmaceutical Sciences 1995;84(6).

⁴¹ Woo S. Y W.J. Jusko.Intespecies comparison of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of human recombinante Erythropoieitin Drug Metabolism 2007.