

**REFERENCIAR ESTE CAPÍTULO:**

Rodríguez Cruz, Y., García Fariñas, A., Amaro Gonzalez, D., García Rodríguez, J.C. (2014). De la Neuroprotección a la Neurorestauración. Evidencias de las Potencialidades de la Neuro-eritropoyetina (Neuro-EPO). En García Rodríguez, J.C. (Ed.). Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. Barcelona, España: OmniaScience; 2014. pp.53-78.

## **De la Neuroprotección a la Neurorestauración. Evidencias de las Potencialidades de la Neuro-eritropoyetina (Neuro-EPO)**

**YAMILA RODRÍGUEZ CRUZ<sup>1</sup>**

**ANAÍ GARCÍA FARIÑAS<sup>2</sup>**

**DANIEL AMARO GONZALEZ<sup>3</sup>**

**JULIO CÉSAR GARCÍA RODRÍGUEZ<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Médico, Jefe laboratorio de Investigaciones. Departamento de Histología. ICBP “Victoria de Girón”.Universidad de Ciencias Médicas de la Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Doctora en Ciencias de la Salud. Escuela Nacional de Salud Pública, Cuba.

<sup>3</sup>Ingeniero, Doctor en Ciencias Técnicas del Instituto Superior Politécnico de Toulouse, Francia.  
Jefe Departamento de Desarrollo de Productos y Formulaciones. Centro de Inmunología Molecular (CIM) La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Bioquímico, Profesor e Investigador Titular, Biotecnólogo de Segundo Nivel, PhD, Doctor en Ciencias de la Salud, Coordinador para Ciencias de la Vida y Notoxicología.  
Oficina del asesor Científico. Consejo de Estado, Cuba.

*juliocesar.neurotox@gmail.com*



## RESUMEN

En este capítulo los autores dan una amplia visión de las potencialidades que tiene la eritropoyetina en su variante de Neuro-EPO aplicada nasalmente. Esta molécula es muy similar a la endógena producida por los astrocitos del cerebro humano. Hasta el presente constituye el único derivado no eritropoyético de la eritropoyetina que no tiene modificaciones químicas en su estructura. Se discuten y muestran sus potencialidades en modelos de isquemia cerebral. Así como, su carácter de gestor natural de la Neuroprotección endógena y su relación con la Neuroglobina (*Ngb*) proteína neuronal necesaria y base moleculares para el desarrollo de los mecanismos de la Neuroprotección endógena, tan necesarios en la repuestas al normal envejecimiento, así como su posible participación en la reparación en los procesos patológicos agudos como la isquemia cerebral o en los crónicos como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer y en las enfermedades genéticas como la Ataxia SCA-2.

Son discutidos los beneficiosos efectos del tratamiento con Neuro-EPO nasal sobre poblaciones neuronales a nivel corticales y subcorticales. Demostrándose la superior eficiencia de la Neuro-EPO por vía nasal, al ser comparada con la eritropoyetina humana recombinante cuando es aplicada intraperitonealmente en modelos de isquemia cerebral.

Se discuten las ventajas del soporte trófico durante el proceso del envejecimiento cerebral y la participación que tiene la Eritropoyetina en estos procesos. Desde el propio neurodesarrollo hasta la restauración neurológica. Potenciar las células totipotenciales existentes en el cerebro humano constituye un reto y tal vez una de las pocas vías seguras, factibles y bioéticamente aceptables para acometer la necesaria neuro restauración una vez que las acciones y funciones de nuestro cerebro lo requieran.

Este capítulo además dispone de una amplia caracterización de las ventajas para la producción de la Neuro-EPO por la biotecnología. Lo cual constituye un sólido soporte para lograr en cantidades necesarias un neuroprotector de forma estable y segura, que permitan un sólido soporte para su utilización a gran escala y así satisfacer la creciente demanda a nivel mundial.

Finalmente un enfoque económico se realiza a la actividad de neuroprotección farmacológica donde se introduce el término costo-efectividad de las posibles alternativas terapéuticas, en aras de proporcionar las necesarias evidencias

para un proceso de toma de decisiones informado por parte de las autoridades sanitarias a los diferentes niveles.

## **1. Breve historia de la eritropoyetina**

Hoy, en la segunda década del siglo XXI conocemos a la eritropoyetina (EPO) como una hormona glicoproteica cuya función más conocida es su participación en el proceso de eritropoyesis. Aunque, cada vez son conocidas otras importantes funciones de la EPO, en particular a aquellas relacionadas con la supervivencia celular en el sistema nervioso central (SNC).

Hace 150 años, el médico francés Denis Jourdanet reconoció indirectamente la relación entre la menor presión parcial de oxígeno en sangre y la elevación del número de eritrocitos cuando estudió los niveles de hematocrito en personas que habían permanecido mucho tiempo viviendo en las alturas de los Alpes. El describió que la sangre de estas personas era más viscosa que las de sus pacientes que vivían a menor altura. Friedrich Miescher describió, en 1893, la formación de eritrocitos como resultado de una disminución de oxígeno en la médula ósea.

No es hasta 1906, cuando el francés Paul Carnot y su colaboradora Catherine Deflandre plantean por primera vez una hipótesis de que un factor humoral podía regular la formación de la sangre [1]. Su trabajo fue en el campo de la experimentación animal. Ellos aplicaron sangre de conejos sanos a conejos anémicos, detectando que en estos últimos, después del tratamiento los glóbulos rojos aumentaban de forma significativa. Esta hipótesis fue objeto de fallidos experimentos, los que se encaminaron a reproducir el reporte del resultado de Carnot y Deflandre en 1906. Fue necesario esperar 42 años hasta llegar al año 1948 donde dos nefrólogos finlandeses, Eva Bonsdorff y Eva Jalavisto le dieron el nombre de eritropoyetina (EPO) a este factor [2].

No obstante estas realidades históricas, hoy se reconoce como el descubridor de la EPO a Allan Jacob Erslev, quién publicó, en 1953, los primeros artículos científicos en los que se probaba sin duda alguna la existencia de la EPO [3]. Otro importante aporte es realizado en 1957 en la Universidad de Chicago donde Goldwasser y su colaborador Leon Orris Jacobson pudieron demostrar que la EPO se forma en el riñón [4], y fue aislada por vez primera de la orina humana 20 años después por Miyake, Kung y Goldwasser [5].

En los últimos 20 años del siglo XX se produce una revolución con las técnicas del ADN recombinante. En esos momentos el escenario del conocimiento estaba preparado para que en 1983, Fu-Kuen Lin, un empleado de Amgen, identificara el gen de la EPO humana [6]. En 1984, Sylvia Lee-Huang, de la Universidad de Nueva York, informó por primera vez la clonación y expresión de EPO recombinante humana (rhuEpo) en la bacteria *Escherichia coli* [7]; lo que luego fue logrado también en células de mamífero (células CHO) [6]. De esta forma, se hizo posible la producción de rhu-Epo en grandes cantidades hasta el presente.

## **2. Funciones no eritropoyética de la EPO**

La EPO, además de estimular la proliferación, diferenciación y maduración de los eritrocitos y otras células hematopoyéticas, lo cual le confiere reconocida eficacia para el tratamiento de la anemia, se le han atribuido otros efectos fisiológicos que la relacionan con el tratamiento de la isquemia cerebral a través de una cascada de fosforilación que incluye la vía de la Janus quinasa-2 y la familia de serina/treonina quinasa [8], y vías de transducción de señales y activadores de la transcripción [9] que convergen en el efecto sobre la familia de las proteínas BCL, las cuales protegen las neuronas de la apoptosis.

Desafortunadamente, estos efectos se han logrado con la EPO que tienen un elevado contenido de ácido siálico (resto de carbohidratos) en su estructura que lo protege del metabolismo hepático y por tanto es capaz de inducir la eritropoyesis. Lo cual es un hecho indeseado ante un evento vascular. Ya que cualquier incremento en la viscosidad de la sangre puede favorecer un nuevo proceso trombótico y complicar el cuadro clínico del paciente. Esta realidad se hace más crítica por el hecho de que la EPO no atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica, no existiendo una ventana de dosis terapéutica que permita alcanzar niveles terapéuticos de la EPO en el SNC sin tener un efecto proliferativo en las células sanguíneas. Así las cosas, en la última década se han desarrollado un creciente número de derivados de la EPO que no presentan capacidad eritropoyética pero sí capacidad Neuroprotectora en el SNC.

### **3. Variantes No eritropoyéticas con capacidad Neuroprotectora de la EPO**

Recientemente, algunas nuevas eritropoyetinas sin la actividad eritropoyética han sido desarrolladas. Estas nuevas moléculas, conservan su habilidad de proteger el tejido nervioso ante diferentes lesiones, como la hipóxia. Estas nuevas moléculas son: la Asialo Eritropoyetina (AsialoEPO) [10,11]; EPO carbamilada (CEPO) [12,13], y la EPO con Bajo contenido de ácido siálico (Neuro-EPO) [14-20].

#### *3.1. AsialoEPO*

La AsialoEPO conserva la acción de neuroprotectora y se obtiene por la desialización total de la EPO, es decir a través de un procedimiento enzimático para la eliminación de todos sus residuos de ácido siálico. Esta molécula mantiene la misma afinidad por los receptores de la EPO y sus propiedades neuroprotectoras, su vida en sangre es muy breve por lo cual no induce la eritropoyesis [21].

Erbayraktar y colaboradores, 2003 han mostrado la actividad protectora de la AsialoEPO en modelos de isquemia cerebral, compresión de la médula espinal, y la lesión del nervio ciático. Adicionalmente, AsialoEPO protege en modelo de rata de 7 días de nacidas afectadas por isquemia hipoxia neonatal con efectividad similar a lograda por la EPO [22].

#### *3.2. CEPO*

Otra molécula modificada de EPO que manifiesta únicamente la acción neuroprotectora sin la actividad de eritropoyética es la EPO carbamilada conocida como CEPO. Esta se obtiene a través de la reacción química de carbamilación de todos los residuos del aminoácido lisina dando como resultado de EPO carbamilada (CEPO) [23].

CEPO, similar a lo AsialoEPO, carece del efecto eritropoyético, pero mantiene los efectos neuroprotectores en biomodelos de isquemia cerebral, neuropatía diabética, y encéfalo mielitis autoimmune experimental. Estos efectos son hasta cierto punto, comparables a los obtenidos con EPO [24].

Es importante notar que CEPO tiene una afinidad mínima para el receptor de la EPO y que sus efectos son mediados por un receptor diferente al receptor de la EPO (EPOR). Se postula que su acción es mediada por un monómero del EPOR unido a un dímero del receptor común (CR) [25]. Otra investigación realizada en modelo

de isquemia cerebral focal en rata, demostró que el tratamiento intravenoso con CEPO logró recuperación funcional de los animales lesionados y tratados [26].

Un creciente número de resultados experimentales preclínicos avalan las propiedades neuroprotectoras de la CEPO en diferentes lesiones del SNC [27-29] así como su seguridad para no alterar sobre la homeostasis de la sangre en los modelos donde ha sido aplicada [30].

### 3.3. *Neuro-EPO*

Durante la producción biotecnológica de rHu-EPO, son obtenidas varias isoformas con contenido diferentes de ácido de siálico. Cuando el contenido de ácido siálico por mol de proteína es menor de 10, es considerada ésta EPO que tiene insuficiente protección para ser usada como agente eritropoyético, ya que su vida en sangre será relativamente corta y será degradada en el hígado. A través un proceso tecnológico que se explica más adelante en este capítulo, esta proteína es obtenida a través de diferentes pasos de purificación hasta obtener una forma de eritropoyetina con bajo contenido de ácido siálico que hemos denominado Neuro-EPO. Este nombre viene dado por su similitud a la que se sintetiza en el cerebro mamífero [16]. La Neuro-EPO cuando pasa a la sangre es rápidamente degradada por las proteasas hepáticas, por lo cual no puede hacer su efecto inductor de la síntesis de nuevos eritrocitos.

Por lo tanto, esta molécula debería ser administrada por una ruta no sistémica, como la ruta de intranasal, para prevenir su degradación hepática. La administración intranasal de Neuro-EPO ha demostrado ser segura; la molécula alcanza el cerebro rápidamente, no estimula la eritropoyesis después de los tratamientos agudos, y ha evidenciado la necesaria eficacia en algunos modelos de roedor con isquemia cerebral y en primates no humanos su paso al cerebro. La Neuro-EPO ha sido efectiva en los estudios preclínicos en diferentes biomodelos de enfermedades neurodegenerativas. La Neuro-EPO se ha desarrollado como un nuevo producto para el tratamiento de la fase aguda del infarto cerebral [14,15 y 17] así como en modelos no transgénicos de la enfermedad de Alzheimer [31]. Una descripción más detallada de los efectos en modelo de la enfermedad de Alzheimer aparece en el Capítulo “I” de este libro.

#### **4. La Neuroprotección endógena y la relación Neuro-EPO y Neuroglobina**

Como enfrentar el daño que produce la concomitante pérdida del nivel crítico de oxígeno y de glucosa, por la caída súbita del flujo sanguíneo cerebral en una determinada región del encéfalo, constituyen un reto no superado por las neurociencias del siglo XXI.

Es nuestro criterio que potenciar la neuroprotección endógena es una de las estrategias más prometedoras para lograr en el menor tiempo posible, el menor daño al cerebro después de una isquemia cerebral. Sin lugar a dudas, esto constituye una alternativa terapéutica rápida y segura. En esta sesión pretendemos de forma muy breve explicar nuestra visión de como realizar ésta estrategia y explicar los avances logrados por nuestro grupo y de otros colectivos científicos que trabajan también en esta dirección.

Existe hoy un amplio consenso de que la Neuroglobina (Ngb) tiene función neuroprotectora endógena sobre las neuronas del SNC de los mamíferos [32]. La Ngb es una de las proteínas de la gran familia de las globulinas y está expresada específicamente en las neuronas del cerebro.

Un creciente número de evidencias han demostrado que la Ngb es un único neuroprotector endógeno que se sobre expresa al nivel de las neuronas después de un ataque isquémico, lo cual, fuertemente sugiere su importante contribución en los mecanismos endógenos, a nivel neuronal en la respuesta al infarto cerebral.

Es conocido que en los últimos 20 años, más de cien ensayos clínicos desarrollados para evaluar putativos neuroprotectores contra la isquemia cerebral, con acción demostrada en disímiles puntos de la denominada cascada de la isquemia cerebral (*Figura 1*), con acción inhibitoria o bloqueadora de pasos aparentemente críticos en esta cascada han tenido un fallo rotundo. Así las cosas, hemos llegados hasta la segunda década del siglo XXI sin poder asignar la esperada categoría de neuroprotector isquémico a ninguno de los fármacos desarrollados y-o evaluados hasta el presente.

Sin embargo, todo este esfuerzo ha permitido disponer de un nivel de conocimiento a nivel molecular, que lo podemos considerar como enorme y tal vez para algunos insuficientes para el propósito deseado. Pero para otros, existen nuevas posibilidades de lograr la anhelada neuroprotección partiendo del conocimiento alcanzado en las múltiples investigaciones. En particular, los estudios de pre-

condicionamiento han demostrado la activación de mecanismos proteccionistas endógenos, que pueden prevenir o sensiblemente limitar el daño al cerebro post isquemia.

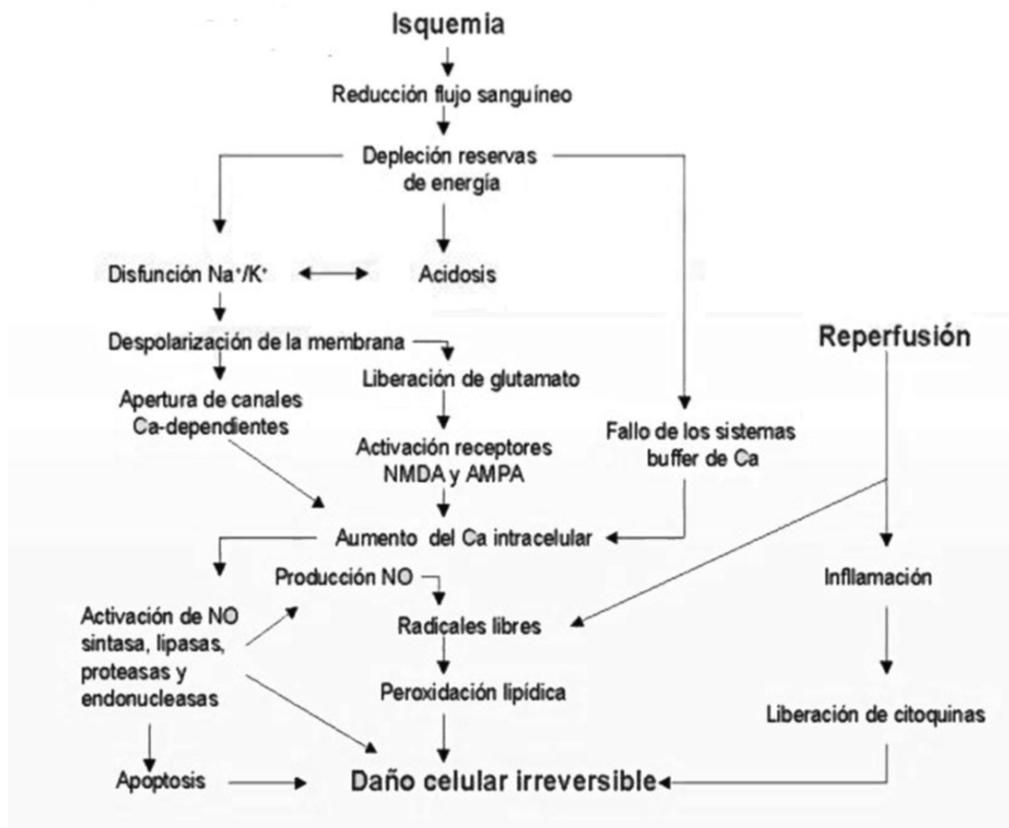


Figura 1: Cascada de eventos bioquímicos que se producen en la isquemia cerebral.

El potenciar estos mecanismos de la protección endógena podría ser la más prometedora de las estrategias para desarrollar las nuevas terapias contra la isquemia cerebral y otros desordenes como la Enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento. Con este punto de vista, se nos presenta con absoluta claridad la Ngb (globina oxígeno-obligatoria) la cual favorablemente y específicamente se expresan en las neuronas del cerebro.

La expresión del gen de la Ngb se correlaciona inversamente con la severidad del daño histológico y con el déficit funcional después del ataque isquémico [33-36]. Adicionalmente, la pérdida Ngb acelera el deterioro del área del cerebro afectada por la hipoxia isquémica [37].

Por ser la Ngb una proteína del intracelular, la posibilidad de incrementar sus niveles por aporte exógeno es considerada una terapéutica impracticable, sobre todo si tenemos en consideración las características del encéfalo y su selectiva protección y complejidad funcional y la disímil y notable alteración reinante, que pudiéramos considerar como un caos celular que se genera por el evento de la hipoxia-isquémica. A pesar de las realidades expresadas, nuevos acercamiento han dado indicios que se pueden potenciar, al menos al nivel preclínico los niveles de expresión de la Ngb en diferentes modelos de isquemia cerebral.

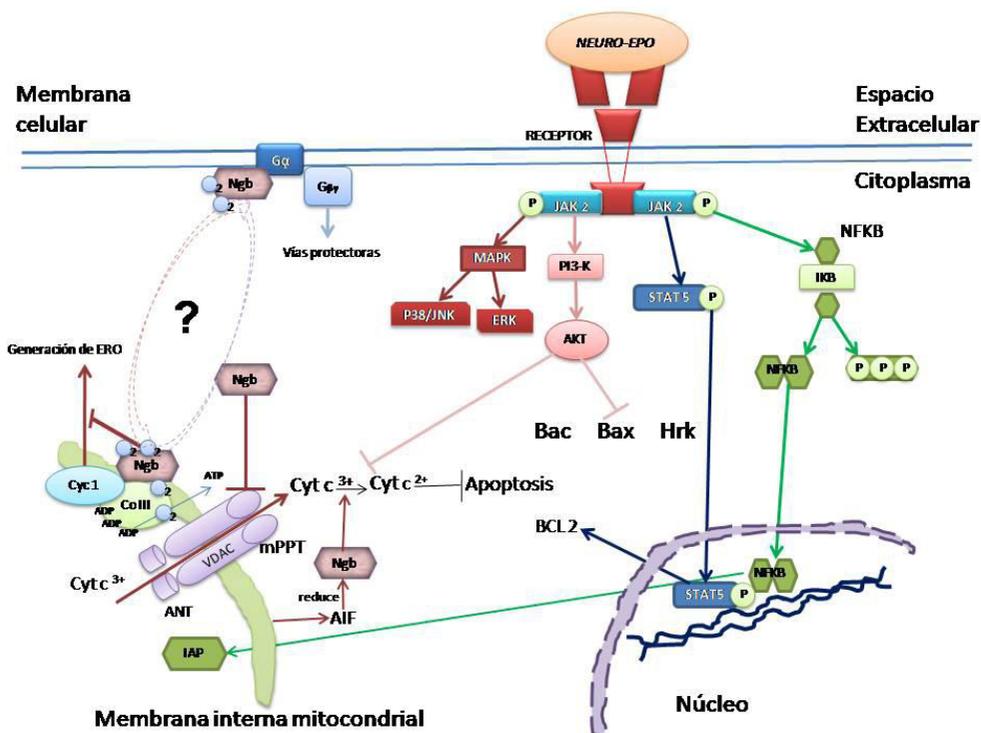
Recientes publicaciones demostraron que la Ngb participa en los mecanismos de la neuroprotección logradas por algunos compuesto, logrando un incremento de los niveles de expresión de la Ngb en regiones específica del encéfalo hipóxico-isquémico. Entre los fármacos utilizados está el ácido Valproico [38]; 17 beta-estradiol [39] y nuestros resultados con la aplicación nasal de la Neuro-EPO [40].

Proponer una explicación de los mecanismos de acción de la Neuro-EPO intranasal en la modulación de la expresión de la Ngb durante el tratamiento de la fase aguda de la isquemia, constituye uno de los objetivos a desarrollar. Sin embargo podemos especular que estas moléculas (Neuro-EPO y Ngb) pueden favorecer los mecanismos de restauración y neuroplasticidad en los animales isquémicos, postulados por nuestro grupo de investigación [16].

Un putativo mecanismo a nivel neuronal que explica incremento de los niveles de Ngb por la aplicación de Neuro-EPO en modelos de isquemia cerebral se ilustra en la *Figura 2*.

De confirmarse ésta hipótesis a nivel clínico, abriría nuevas posibilidades terapéuticas para estimular la regeneración del tejido y la recuperación de áreas cerebrales usando un método seguro y no invasivo, como es la vía intranasal. Constituyendo la aplicación de la Neuro-EPO una forma eficiente y segura de potenciar la neuroprotección endógena en el cerebro isquémico [40].

Los resultados obtenidos en los modelos de isquemia cerebral con la aplicación de la Neuro-EPO por la vía intranasal, demuestran el paso de la molécula al SNC.



**Figura 2:** La Neuro-EPO se enlaza al receptor dímérico de la EPO y estimula la actividad quinasa JAK2 dando como resultado la fosforilación de JAK2 y del receptor de la EPO. La JAK2 activada iniciará una traducción de señales moleculares tales como: STAT-5, MAPK, ERK, PI (3) K/AKT y IKB, el cual adquiere la forma disociada NFKB. El NFKB y STAT5 penetran al núcleo neuronal, se enlazan al DNA y transcriben genes neuroprotectores como EPO; EPOR; bcl2 y posiblemente el gen de la Ngf, el cual evitará la muerte neuronal por apoptosis a nivel mitocondrial, interactuando por ejemplo Cyc 1 e inhibiendo la generación de especies reactivas del oxígeno en el complejo III mitocondrial y evitando la liberación del Cyt c3 al espacio citoplasmático y el desencadenamiento de mecanismos de apoptosis. Probablemente, otras funciones a este nivel como lograr una mayor eficiencia de la cadena respiratoria, al nivel del Complejo 2 y 3 garantizando los niveles de oxígeno para la formación de ATP. Nuestra hipótesis es que existe un ciclo de la Ngf a nivel de membrana citoplasmática hasta la membrana mitocondrial para el transporte de oxígeno (representado con flechas discontinuas), el cual se estimula por la Neuro-EPO en condiciones de hipoxia.

Su efecto terapéutico en la estructura morfológica y la función cerebral y su seguridad en la fase aguda del infarto cerebral tanto en modelos de isquemia e isquemia reperusión, sugiriendo así el efecto neuroprotector y su capacidad de potenciar la neuroprotección endógena a través de un incremento sostenido de los niveles de expresión de la Ngf, al menos hasta 5 semanas post infarto isquémico y con tratamiento de Neuro-EPO por la vía intranasal [40].

A continuación describiremos los aspectos tecnológicos más relevantes de la obtención de la Neuro-EPO.

La Neuro-EPO es una solución de la Eritropoyetina humana recombinante de bajo contenido de ácido siálico (EPObás) en una solución polimérica de HPMC que se administra por vía nasal. El ingrediente farmacéutico activo es la Eritropoyetina humana recombinante de bajo contenido de ácido siálico (EPObás) la cual se obtiene de la purificación de Eritropoyetina a escala industrial en el paso cromatográfico de intercambio iónico. Con este ingrediente activo se ha desarrollado una formulación neuroprotectora contra daños al sistema nervioso central (SNC) que ha sido evaluada en diferentes modelos animales. Este efecto se logra a través de la potenciación de mecanismos antiapoptóticos, antiinflamatorios, neurotróficos y moduladores de la excitabilidad neuronal. Su acción esta mediada por los receptores que se encuentran en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales; los astrocitos y las neuronas.

## **5. Descripción del proceso productivo**

### *5.1. Proceso de fermentación para la producción de Eritropoyetina Humana Recombinante isoformas básicas para la tecnología de tanque agitado.*

#### 5.1.1. Descongelación

El primer paso del proceso de producción es la descongelación de un ampulla del banco de trabajo. Las ampulas deben contener una cantidad de células  $\geq 5 \times 10^6$  células con una viabilidad  $\geq 80\%$ . Una vez descongeladas, las células se resuspenden en medio libre de proteínas, luego se siembran en frascos "T" para comenzar la expansión. La operación se realiza en cabina de flujo laminar.

#### 5.1.2. Expansión en frascos "T"

Las células resuspendidas en medio fresco libre de suero, se incuban en frascos "T" de cultivo de 175 ó 225 cm<sup>2</sup> a una concentración inicial  $\geq 0,25 \times 10^6$  células/mL. El proceso debe durar entre 48 y 96 horas hasta alcanzar una masa celular confluyente. La operación se realiza en condiciones asépticas bajo cabina de flujo laminar.

### 5.1.3. Expansión en Botellas Rotatorias

Una vez confluyente la suspensión celular proveniente de los frascos "T" de 175 ó 225 cm<sup>2</sup> se une para ser sembrada en botellas rotatorias  $\geq 0,25 \times 10^6$  células/mL. Esta etapa debe durar alrededor de 7- 9 días y se alcanza una masa celular total  $\geq 500 \times 10^6$  células. A continuación las células se transfieren a otras botellas rotatorias con medio de cultivo fresco. Luego de 3 ó 4 días de cultivo, debe alcanzarse una densidad celular  $\geq 0,6 \times 10^6$  células/mL.

### 5.2. Inóculo a partir de Botellas Rotatorias

Se toma una muestra de 1 mL de cada botella rotatoria para cuantificar a las células y determinar la viabilidad celular. Se seleccionan las botellas rotatorias que se emplearan en la confección de inóculo teniendo en cuenta que el número de células totales debe ser  $\geq 3\ 000 \times 10^6$ , la viabilidad celular  $\geq 80\ %$  y el volumen de suspensión celular total es 5 L. La suspensión celular proveniente de cada botella rotatoria de 500 mL es trasvasada hacia el frasco de inóculo de 5 L.

#### 5.2.1. Fermentación de producción en fermentador de 30 L

Verificada la esterilización se comienza el proceso de inóculo del fermentador a partir de botellas rotatorias. Una vez que el inóculo esté listo y ha sido aceptado se transfiere al fermentador semilla. Una vez que las células alcanzan la densidad celular máxima  $\geq 1,0 \times 10^6$  células/mL, se comienza a adicionar el medio de cultivo hasta alcanzar el volumen de trabajo de 30 L y la población celular sea mayor que  $24\ 000 \times 10^6$  células. Una vez completado el volumen de trabajo se inicia el proceso de perfusión con el objetivo de incrementar la biomasa. Cuando se alcance una cantidad de células totales mayor de 60 000 millones se procederá a transferir el volumen de sobrenadante que contiene la cantidad de células requeridas hacia el fermentador de 1000L. Durante la fermentación, alrededor de 4 días se dedican a crecer el cultivo en la fase a templa y más de 15 días al proceso en perfusión.

#### 5.2.2. Fermentación a escala de producción de 1000 L

El propósito del Fermentador de Tanque Agitado 1000L, es la obtención de sobrenadante rico en Eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) a partir del cultivo de las células CHO-TA encargadas de su excreción. (*Figura 3*)



*Figura 3: Vista del Fermentador.*

---

### 5.2.3. Cosechas

La cosecha se comienza una vez que se inicia la perfusión y/o el cultivo continuo. Se colecta en bolsas estériles y apirogénicas de 500 L, 1000 L ó 2 500 L. Una vez llena la bolsa de cosecha, se retira la misma y se filtra por una batería de filtros cuyo poro inferior es de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 5.3. *Proceso de purificación para la producción de Eritropoyewtina Humana Recombinante isoformas básicas para la tecnología de tanque agitado.*

### 5.3.1. Cromatografía de pseudo-afinidad Blue sepharose Fast Flow

El primer paso se realiza empleando la cromatografía de afinidad. El objetivo de este paso es la captura de Eritropoyetina y la eliminación parcial de los principales contaminantes presentes en el sobrenadante.

### 5.3.2. Cromatografía de pseudo-afinidad por quelatos metálicos

Este paso se realiza empleando la cromatografía de afinidad por quelatos metálicos. El objetivo de este paso es la captura de la Eritropoyetina y la eliminación total de la fracción de contaminantes que no fueron removidos en los pasos anteriores del proceso.

Después de equilibrada la columna, se aplica la elución del paso anterior y finalizada la aplicación, se continúa pasando solución de equilibrio, luego se hace circular a través de la columna buffer de elución permitiendo que eluya el ingrediente activo. La elución de la matriz se filtra y almacena a 40C, para su posterior tratamiento.

### 5.3.3. Cromatografía de intercambio iónico

Este paso se realiza empleando la cromatografía de intercambio iónico. El objetivo de este paso es la separación de las isoformas ácidas de las básicas, la remoción de ADN y realizar la concentración del producto. En este paso se eleva la pureza del ingrediente activo por encima del 98 %.

### 5.3.4. Cromatografía de filtración en gel

Esta operación se realiza empleando una cromatografía de exclusión por tamaño. Este paso tiene como objetivo realizar un cambio de buffer de la proteína, dando lugar así a la materia prima activa.

Una vez terminado el paso cromatográfico se realiza la filtración esterilizante del producto.

Finalmente se realiza la higienización, la limpieza y el mantenimiento de la columna.

Para la higienización se aplica la solución NaOH 0,5 M, para la limpieza se emplea la solución NaOH 1 M y la solución de mantenimiento es NaOH 0,01 M.

### 5.3.5. Ultrafiltración/Diafiltración. (Etapa de concentración)

El pool de MPA es concentrado a través de una membrana de polyetersulfona de 10 kDa, hasta alcanzar una concentración de proteína dentro del intervalo establecido en las especificaciones del IFA.

La etapa de concentración consiste en reducir el volumen total del pool de la elución de las isoformas básicas hasta alcanzar un intervalo de concentración de proteína entre 1,8 y 2,4 g/L.

Ajuste de la concentración final y adición de Tween 80.

Luego de obtener la concentración deseada, se procede a la adición de Tween 80 según la masa de proteína, con el objetivo de estabilizar la proteína en el tiempo.

### 5.3.6. Filtración esterilizante

El objetivo de este paso es mantener el producto libre de contaminación microbiana hasta que se someta al proceso de formulación. El paso de filtración se realiza con filtros cuya membrana tiene una porosidad de 0,2  $\mu\text{m}$  y su material de construcción es inerte con relación al producto, los mismos están acoplados a bolsas de 5L estériles y apirogénicas en donde será almacenado el producto a 4°C (Figura 4).



**Figura 4:** Vistas de los diferentes procesos industriales de obtención de la Neuro-EPO.

---

### 5.3.7. Formulación

La formulación de la Neuro-EPO está compuesta por varios excipientes, los cuales tienen un proceso previo de preparación antes de ser utilizados en el formulado. Estas preparaciones consisten en la obtención del polímero concentrado y la obtención de la solución estéril concentrada de isotonzante, promotor de absorción. (Patente: Formulaciones nasales de EPOrh con bajo contenido de ácido siálico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. No.2758-2008, 2009).

Finalmente presentamos un enfoque económico de la actividad de neuroprotección farmacológica con el objetivo de minimizar las barreras de acceso a los sistemas de salud pública. en aras de proporcionar las necesarias evidencias para un proceso de toma de decisiones informado por parte de las autoridades sanitarias a los diferentes niveles.

## **6. Los aspectos económicos en el entorno de la evaluación e introducción de las tecnologías sanitarias**

La molécula Neuro-EPO se inserta en un entramado complejo de potencialidades de intervención farmacológica dirigidas a la neuroprotección que va desde: el reconocimiento de la cascada isquémica que ha representado una de las oportunidades de intervención farmacológica [41] los flavonoides para los que se han descrito efectos protectores en diversas condiciones patológicas como la isquemia cardiovascular, diabetes mellitus, hipercolesteremia, la aterosclerosis y el cáncer [42], hasta las potencialidades aportadas por las nanotecnologías como estructuras transportadoras de sustancias activas con fines neuroprotectores ó como potenciadores de la neurogénesis y migración de células de una zona del cerebro a otra [42] No obstante, este aparente prometedor y prolijo entorno, desafortunadamente hasta hoy no muestra resultados clínicos concluyentes a favor de ninguno de los candidatos.

El éxito del enfrentamiento del problema de salud que representan hoy las enfermedades neuro y heredo degenerativas dependerá no sólo de que finalmente se logre contar con una terapia que “genere beneficios y efectos perdurables por influir de manera favorable sobre la etiología o patogenia subyacente impidiendo o demorando el inicio de la enfermedad o el deterioro clínico gradual” , de manera segura, eficaz y efectiva, sino que será necesario que devenga en una tecnología eficiente tal que se viabilice el acceso a ella por parte de grandes poblaciones.

En consecuencia, la contemporaneidad se distingue por que al evaluar una tecnología sanitaria se examinan las consecuencias clínicas, sociales, económicas y legales que se producen a corto y largo plazo derivadas de su uso. En este contexto se visualiza cada vez con mayor fuerza y claridad la incorporación de preguntas tales como: ¿qué tecnología deberá introducirse para el uso por las grandes poblaciones? y ¿quién deberá asumir el financiamiento de estas? Entre los elementos a considerar para responder estas interrogantes están los de naturaleza

económica. Por ello cada vez con mayor frecuencia se puede encontrar en las agendas, tanto de las agencias o autoridades reguladoras de medicamentos, los directivos de los sistemas de salud como de la población en general la exigencia de considerar aspectos relativos a los costos y su relación con los resultados en salud aportados por las nuevas propuestas farmacológicas.

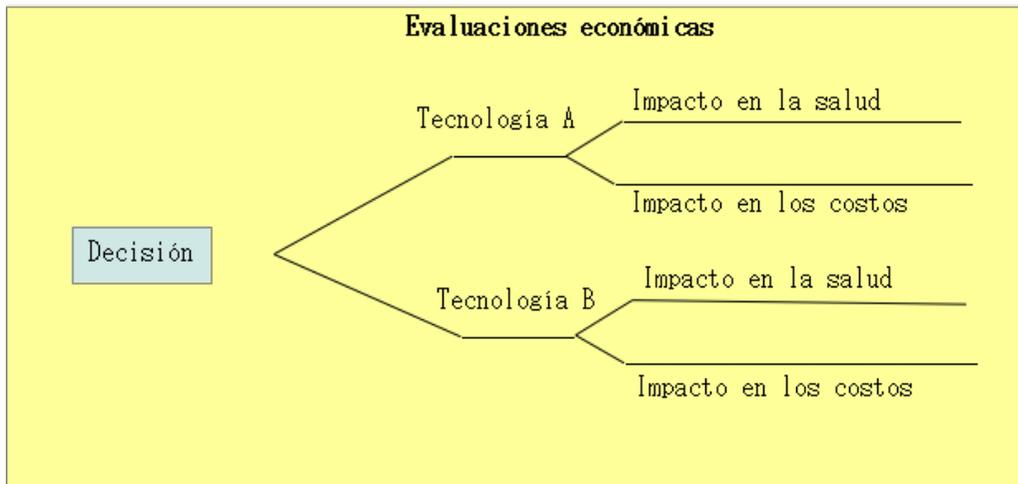
Desde la última mitad del siglo pasado y hasta nuestros días se observa cómo aumentan los países que reconocen desde su marco legal que para el registro de una nueva tecnología sanitaria, digamos por ejemplo un medicamento, deberá contarse con elementos probatorios ya no solo de su seguridad, eficacia y efectividad sino que también deberán aportarse evidencias de la eficiencia. Este último requisito alcanza especial relevancia para fines como establecer precios, incluir tecnologías entre aquellas financiadas por los fondos públicas o definir políticas reembolso. Esto se basa en que generalmente los recursos disponibles no alcanzan para financiar todas las nuevas tecnologías que se necesitan y han probado ser seguras y eficaces. Se trata de priorizar, en términos de financiamiento público y garantía de acceso aquellas tecnologías que aporten valor en relación con el coste que suponen para la sociedad [43,44].

En los años 90 del pasado siglo comenzó el proceso de incorporación de los aspectos económicos por parte de las jurisdicciones y agencias reguladoras o evaluadoras de tecnologías sanitarias. Australia, en 1993, fue el primer país en considerar los elementos adoptados por las evaluaciones económicas para la decisión del reembolso financiero de los medicamentos. En el Reino Unido, desde la creación del National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) en 1999, dependiente del Servicio Nacional de Salud, constituye probablemente la piedra angular en la formalización de los aspectos económicos a través de la exigencia de la presentación de resultados de evaluaciones económicas como soporte para la toma de decisiones en salud para Inglaterra y Gales. Además países como: Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Irlanda, Holanda, Noruega, Portugal, Suecia, Hungría, Nueva Zelanda, Korea, Canadá, Suecia y Alemania han incorporado de manera formal el uso de la evaluación económica de tecnologías sanitarias [45]. En Chile, recientemente, economistas de la salud han propuesto que la naciente Agencia Nacional de Medicamentos incorpore la solicitud de los elementos de corte económico [46]. Otra de las expresiones de cómo el tema va ganando espacio ha sido la emisión de guías metodológicas a nivel nacional. En la región de Latinoamérica, Brasil, México, Colombia y Cuba ya han establecido los lineamientos esenciales

para la evaluación económica a través de la emisión de guías metodológicas locales [47,48].

En la actualidad existen dos indicadores fundamentales que constituyen la evidencia de en qué medida puede considerarse eficiente una nueva tecnología sanitaria: el impacto presupuestario y la razón costo efectividad. El primero se refiere a la necesidad de contar con un estudio que permita evaluar si la autoridad puede efectivamente financiar la introducción de la nueva tecnología para toda la población. El segundo se calcula a través de la realización de una evaluación económica (EE).

Una EE se define como un análisis comparativo de cursos alternativos de acción, en términos de sus costos y consecuencias [49].



*Figura 5. Representación esquemática de la evaluación económica como análisis comparativo de cursos de acción alternativos sobre la base de la relación entre sus efectos en la salud y sus costos.*

---

Existen 4 tipos fundamentales de estudios de evaluación económica:

- Estudio de minimización de costos (EMC): Se comparan una o más opciones que tiene el mismo resultado sanitario en igualdad de circunstancias y con los mismos riesgos y efectos secundarios. Solo se comparan los costos netos directos de las alternativas para identificar la menos costosa.

- Estudio de costo-beneficio (ECB): Forma de evaluación económica en la que tanto los costos como las consecuencias vienen expresados en términos monetarios.
- Estudio costo-efectividad (ECE): Se identifican y cuantifican los costos y los resultados de diversas opciones o procedimientos alternativos para alcanzar un mismo objetivo, donde los costos vienen expresados en términos monetarios y las consecuencias (efectos) en unidades físicas o naturales.
- Estudio de costo-utilidad (ECU): Se identifican y cuantifican los costos y los resultados de procedimientos alternativos para alcanzar un mismo objetivo, donde los costos vienen expresados en términos monetarios y las consecuencias (utilidades percibidas y valoradas subjetivamente por los usuarios) en términos de calidad de vida percibida o períodos de tiempo saludable. Por ejemplo: Años de vida ajustados por calidad (QUALYS o AVAC) y Años de vida ajustados por discapacidad (DALYS o AVAD).

Una vez identificados y valorados los resultados en la salud y los recursos, es necesario relacionarlos para comparar la eficiencia de cada opción. Para esto se debe en primer lugar calcular los valores medios de las razones costos efectividad de cada opción en estudio y posteriormente realizar el análisis incremental donde se comparan, entre pares, las razones costos/resultados de las opciones 50.

La razón costo efectividad incremental, se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$CEI = \frac{(costo_A - costo_B)}{(efectividad_A - efectividad_B)}$$

donde: CEI: razón costo efectividad incremental

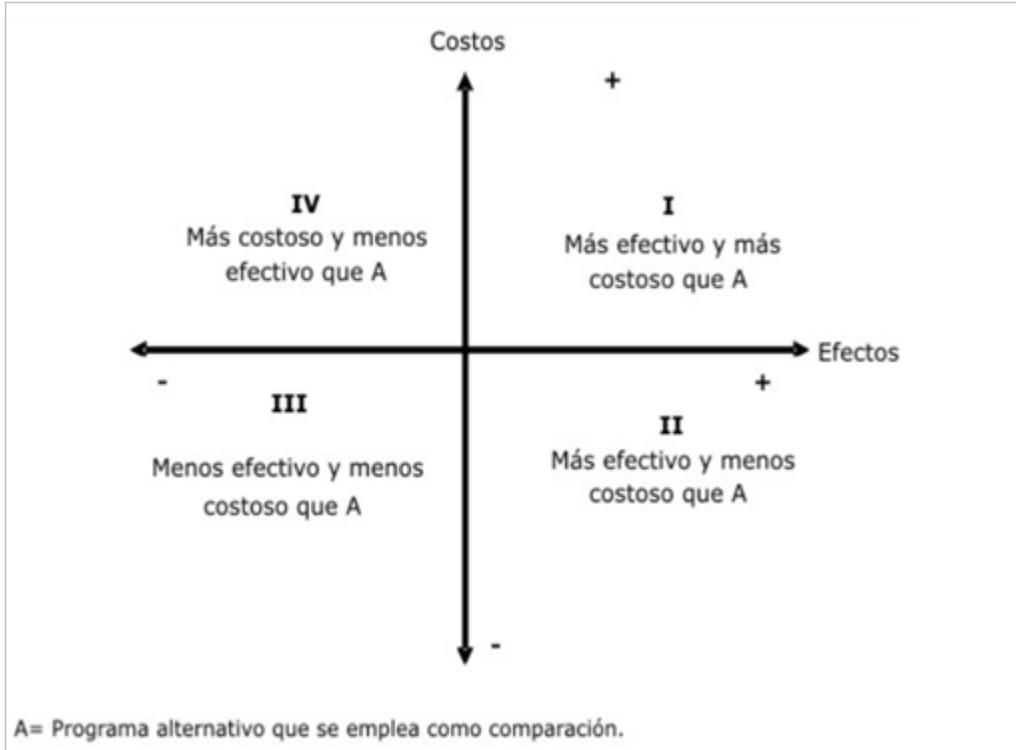
costoA: costo de la tecnología A

costoB: costo de la tecnología B

efectividadA: efectividad de la tecnología A

efectividadB: efectividad de la tecnología B

Otra opción para el análisis de esta razón es la representación gráfica en un plano denominado de costo efectividad.

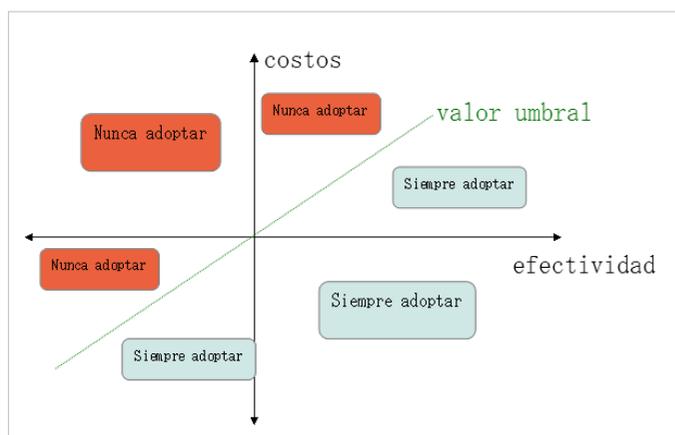


*Figura 6. Plano del costo efectividad*

Cuando la tecnología en estudio clasifica en los cuadrantes II y IV la toma de decisión no representa grandes complicaciones. Por una parte, si la nueva tecnología se ubica en el cuadrante II significa que “domina” a la referencia en tanto logra mayor efectividad a menor costo, lo que la convierte en la opción a elegir desde la perspectiva de la eficiencia, esta situación es muchas veces la deseada pero pocas veces se observa en la práctica; por otra parte si la nueva tecnología se ubica en el IV cuadrante se considera como “dominada” o superada por la de referencia, pues representa mayores costos para lograr menores efectos, lo cual inclina la decisión hacia su desestimación. Cuando las nuevas tecnologías sanitarias toman valores de costos y efectos tales que las ubican en los cuadrantes I y III la decisión pasa por la definición previa de criterios de decisión. En el cuadrante III se logran me-

nores efectos a menores costos vs. la ubicación en el cuadrante I que representa el logro de mayores efectos pero esto a su vez implica costos mayores, para juzgar en que medida el incremento en la efectividad justifica o compensa el costo adicional es necesario un criterio de juicio o regla de decisión.

En principio, cuanto mayor sea la razón costo efectividad, menos eficiente será la tecnología respecto de su comparador, no obstante la valoración absoluta del valor se torna difícil pues el juicio de si elegir o no una tecnología dependerá inexorablemente del comparador empleado, lo cual se complica en el escenario público donde la asignación del financiamiento incluye tecnologías dirigidas a diversos problemas de salud donde no siempre se cuenta con comparadores comunes. De aquí que el análisis persé de las razones costo efectividad media o incremental presenta un desafío adicional. ¿Cómo establecer si un valor dado de costo por unidad de efectividad es demasiado alto o bajo para determinado contexto histórico y geográfico? Ante esta preocupación algunos investigadores han tomado como referencia el valor del PIB per cápita, por ejemplo Brasil, Uruguay y México y han fundamentado el análisis en que cualquier opción que represente un costo por unidad de resultado mayor que la producción media del país no debería considerarse como viable. Esta solución no es compartida por todos los estudiosos del tema, otros países, por ejemplo Inglaterra, han establecido un valor umbral (entre 20000.00libras y 30000.00libras) por debajo del cual se considera pertinente el financiamiento de la tecnología sanitaria con fondos públicos, Australia estableció 50000.00 dólares.



**Figura 7.** Plano del costo efectividad. Reglas de decisión sobre la base de un valor umbral de costo efectividad

En la actualidad el desarrollo de un neuroprotector deberá enfrentar un reto adicional: demostrar ser una alternativa costo efectiva como requisito ineludible para la sociedad contemporánea en aras de garantizar un uso racional de los recursos disponibles, así como de velar por la garantida de la equidad, al menos en términos de acceso a las tecnologías sanitarias. Este es otro de los importantes retos que ha de enfrentar la Neuro-EPO para ser conceptualizada como un neuroprotector, entonces y solo entonces habrá pasado la prueba de la vida.

## **7. Conclusiones**

En conclusión, la estrategia de neuroproteger en el infarto cerebral y otras alteraciones neurodegenerativas es actualmente muy discutida entre los clínicos. Sin embargo, es una propuesta de la investigación en las Neurociencias con un fuerte basamento teórico y sólidos resultados preclínicos con moléculas como la Neuro-EPO donde se ha encontrado un uso muy importante en enfermedades cerebros vasculares y degenerativos que la convierte en un excelente candidato como citoprotector y potenciador de la neuroprotección endógena.

La demostrada eficacia y seguridad de la Neuro-EPO, unida a su aplicación no invasiva permiten un amplio espectro para su aplicación clínica y profiláctica. Estos incluyen la fase aguda de trastornos como la isquemia cerebral a su aplicación en tratamientos crónicos como la enfermedad de Alzheimer o el envejecimiento cerebral.

Los ensayos clínicos, ya iniciados, serán la prueba de concepto que ha de pasar la Neuro-EPO para que pueda alcanzar la categoría no lograda hasta hoy por ningún fármaco desarrollado hasta el presenta, que no es otra que la ser conceptualizado como Neuroprotector.

## 8. Referencias

1. Carnot, P., and Deflandre, C. (1906). Sur pactivité hémopoiétique de sérum au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci* 1, 384-386.
2. Bonsdorff, B.V., and Jalavisto, E. (1948). A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Nord Med* 40, 1830  
• PMID:18225175
3. Erslev, A. (1953). Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8, 349-357.  
• PMID:13032205
4. Jacobson, L.O., and Goldwasser, E. (1957). The dynamic equilibrium of erythropoiesis. *Brookhaven symposia in biology*, 110-131.  
• PMID:13546674
5. Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* 252, 5558-5564.  
• PMID:18467
6. Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., et al. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7580-7584.  
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.22.7580>
7. Lee-Huang, S. (1984). Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 2708-2712.  
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.9.2708>
8. Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin -a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2001; 251(4):179.  
• <http://dx.doi.org/10.1007/s004060170038>
9. Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(26):9855-60.  
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403172101>  
• PMID:15210945 PMCID:PMC470763
10. Kalialis, L.V. and Olsen, N.V. (2003) Erythropoietin--a new therapy in cerebral ischemia? *Ugeskr. Laege* 165, 2477.  
• PMID:12872467
11. Wang, X., Zhu, C., Wang, X., et al. (2004) The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J. Neurochem*. 91(4), 900-910.  
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02769.x>  
• PMID:15525344
12. Kirkeby, A., Torup, L., Bochsén, L., et al. (2008) High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb. Haemost.* 99(4), 720-728.  
• PMID:18392330
13. Lapchak, P.A. (2008) Carbamylated erythropoietin to treat neuronal injury: new development strategies. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17(8), 1175-1186.  
• <http://dx.doi.org/10.1517/13543784.17.8.1175>  
• PMID:18616414
14. Sosa, I., García Rodríguez, J.C., Santana, J., et al. (2006) Intranasal administration of recombinant human erythropoietin exerts neuroprotective effects on post-ischemic brain injury in Mongolian gerbils. *Pharmacology Online* 1, 100-112.
15. Sosa, T.I., Mengana, T.Y., García, S.J.D., et al. (2008) Recombinant human erythropoietin as a neuroprotective therapy in brain ischemia. *Biotecnol. Aplicada* 25, 223-229.
16. Julio César García Rodríguez y Iliana Sosa Testé (2009) The Nasal Route as a Potential Pathway for Delivery of Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in Humans *TheScientificWorld-JOURNAL* 9, 970-981 ISSN 1537-744X; DOI 10.1100/tsw.2009.103
17. Yamila Rodríguez Cruz, Yuneidys Mengana Tâmos, Adriana Mu-oz Cernuda, Nelvis Subirós Martines, Alina González-Quevedo, Iliana Sosa Testé, and Julio César García Rodríguez (2010) Treatment with Nasal Neuro-EPO Improves the Neurological, Cognitive, and Histological State in a Gerbil Model of Focal Ischemia. *TheScientificWorldJOURNAL* 10, 2288-2300 ISSN 1537-744X; DOI
18. Alicia Lagarto Parra y Julio César García Rodríguez. (2012) Nasal EPO could be a Reliable Choice for Neuroprotective Stroke Treatment. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 12, 60-68.
19. Julio César García-Rodríguez and Yamila Rodríguez-Cruz The Therapeutic Potential of Neuro-EPO Administered Nasally on Acute Cerebrovascular Disease. *Current Psychopharmacology*, 2012, 1, 3; 228-232.

- <http://dx.doi.org/10.2174/2211556011201030228>
- 20. Julio César García Rodríguez and Ramón Rama Bretón. Neuro-EPO by Nasal Route as a Neuroprotective Therapy in Brain Ischemia. Chart 3. 59-78 pp. In *Acute Ischemic Stroke*. Editor Julio César García Rodríguez. ISBN 978-953-307-983-7. Intenche Open Access Publisher, 2012.
- 21. Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., et al. (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(11), 6741-6746.
  - <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1031753100>
  - PMID:12746497 PMCID:PMC164517
- 22. Wang, X., Zhu, C., Wang, X., et al. (2004) The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J. Neurochem.* 91(4), 900-910.
  - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02769.x>
  - PMID:15525344
- 23. Lundbeck, H. (2009) Safety Study of Carbamylated Erythropoietin (CEPO) to Treat Patients With Acute Ischemic Stroke. Report No. NCT00756249. [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov)
- 24. Zhang, J., Li, Y., and Cui, Y. (2005) Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Res.* 1034, 34-39.
  - <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.036>
  - PMID:15713257
- 25. Brines, M. and Cerami, A. (2005) Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(6), 484-494.
  - <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1687>
  - PMID:15928718
- 26. Villa, P., van Beek, J., Larsen, A.K., et al. (2006) 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.
  - <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600370>
  - PMID:16835629
- 27. Mahmood, A., Lu, D., and Qu, C. (2007) Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J. Neurosurg.* 107(392), 397.
- 28. King, V.R., Averill, S.A., and Hewazy, D. (2007) Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 26, 90-100.
  - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05635.x>
  - PMID:17614942
- 29. Fu, Zhong-Qiu, Shao, Qing-Liang, Shen, Jing-Ling, Zhang, Yu-Jing, Zhao, Xia-XiaYao, Li (2010) Effect of carbamylated erythropoietin on major histocompatibility complex expression and neural differentiation of human neural stem cells. *Journal of neuroimmunology*, 221, (1-2), 15-24.
  - <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.01.016>
  - PMID:20163877
- 30. Kirkeby, A., Torup, L., Bochsén, L., et al. (2008) High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb. Haemost.* 99(4), 720-728.
  - PMID:18392330
- 31. Maurice T, Mustapha MH, De La C García-Barceló M, Rodríguez Cruz Y, García Rodríguez JC (2012). Intraperitoneal and intranasal formulations of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the oligomeric A 25-35 nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. Program No. 851.11. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.
- 32. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature.* 2000;407:520-3.
  - <http://dx.doi.org/10.1038/35035093>
  - PMID:11029004
- 33. Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. Ng2 is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:15306-11.
  - <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.251466698>
  - PMID:11742077 PMCID:PMC65025
- 34. Peroni D, Negro A, Bahr M, Dietz GP. Intracellular delivery of Ng2 using HIV-1 tat protein transduction domain fails to protect against oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett.* 2007;421:110-4.
  - <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.05.046>
  - PMID:17566657
- 35. Hundahl C, Kelsen J, Kjaer K, Ronn LC, Weber RE, Geuens E, Hay-Schmidt A, Nyengaard JR. Does Ng2 protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of Ng2 expression following transient mcao in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2006;1085:19-27.
  - <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.040>
  - PMID:16647691

36. Wang X, Liu J, Zhu H, Tejima E, Tsuji K, Murata Y, Atochin DN, Huang PL, Zhang C, Lo EH. Effects of Ngb overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2008;39:1869-74.  
• <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.506022>  
• PMID:18403737 PMCID:PMC2727360
37. Sun Y, Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Ngb protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:3497-500.  
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0637726100>  
• PMID:12621155 PMCID:PMC152321
38. Jin K, Mao XO, Xie L, John V, Greenberg DA. Pharmacological induction of Ngb expression. *Pharmacology*. 2011;87:81-4.  
• <http://dx.doi.org/10.1159/000322998>  
• PMID:21228614 PMCID:PMC3042117
39. De Marinis E, Ascenzi P, Pellegrini M, Galluzzo P, Bulzomi P, Arevalo MA, Garcia-Segura LM, Marino M. 17 $\beta$ -estradiol—a new modulator of Ngb levels in neurons: role in neuroprotection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity. *Neurosignals*. 2010;18:223-35.  
• <http://dx.doi.org/10.1159/000323906>  
• PMID:21335947
40. Gao Y, Mengana Y, Cruz YR, Mu-oz A, Testé IS, García JD, Wu Y, Rodríguez JC, Zhang C. Different expression patterns of ngb and epor in the cerebral cortex and hippocampus revealed distinctive therapeutic effects of intranasal delivery of neuro-epo for ischemic insults to the gerbil brain. *J Histochem Cytochem*. 2011;59:214-27.  
• <http://dx.doi.org/10.1369/0022155410390323>  
• PMID:21339183 PMCID:PMC3201137
41. F.J. Fernández-Gómez, F. Hernández, L. Argando-a, M.F. Galindo, T. Segura, J. Jordán. Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *REV NEUROL* 2008; 47 (5): 253-260  
• PMID:18780272
42. Álvarez Fernández G, Bustos Jaimes I, Castañeda Patlán C, Guevara Fonseca J, Romero Álvarez I, Vázquez Meza H. (eds). *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIV, 2010, 143- 154.
43. Amado Guirado E, et al. Mejorar la calidad asistencial no implica financiar públicamente cualquier medicamento. *Aten Primaria*. 2012;749:1-3
44. García Rodríguez JF, García Fari-as A, Gálvez González AM, Rodríguez León GA. Herramientales de la investigación operacional en apoyo a la toma de decisiones en salud. *Revista investigación operacional*. 2012;33(3):245-251
45. Collazo Herrera MM, Gálvez González AM, García Fari-as A y Lara Bastanzuri C. La farmacoeconomía en Cuba. Implementación de su aplicación y proyecciones de trabajo. *Revista española de Economía de la Salud*. 2012;9(2)53-58
46. Espinoza S Manuel Antonio, Cabieses Báltica. Agencia nacional de medicamentos (ANAMED): una oportunidad para ser aprovechada. *Rev. méd. Chile [revista en la Internet]*. 2011 Dic [citado 2013 Ene 22]; 139(12): 1624-1625. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872011001200015&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872011001200015&lng=es).
47. Augustovski F, Garay OU, Pichon-Riviere A, Rubinstein A, Caporale JE. Economic evaluation guidelines in Latin America: a current snapshot. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2010;10(5):525-37.  
• <http://dx.doi.org/10.1586/erp.10.56>  
• PMID:20950069
48. Gálvez González AM, García Fari-as A, Portuondo Sánchez C, Lara Bastanzuri C, Collazo Herrera MM. Evaluación económica en salud y toma de decisiones en el contexto sanitario cubano. *Revista Cubana de Salud Pública* 2012;38(2):253-262  
• <http://dx.doi.org/10.1590/S0864-34662012000200008>
49. Drummond MF, O'Brien B, Stoddart GL, Torrance GW. *Methods for the economic evaluation of health care programs*. 2º ed. Oxford: Oxford University Press; 1997.
50. García Fari-as A, Gálvez González AM, García Rodríguez JF. Aspectos metodológicos críticos en las evaluaciones económicas de salud en el contexto cubano. *Revista Cubana de Salud Pública*. 2010; 36(3).