

La eritropoyetina como factor de protección de la radioterapia sobre células del sistema nervioso central. Estudio *in vitro*

Álvaro Gómez-De la Riva, Alberto Isla-Guerrero, Antonio García-Grande

Objetivo. Investigar el efecto de la eritropoyetina en cultivos celulares de corteza cerebral de ratas cuando se administra radioterapia.

Materiales y métodos. El estudio se desarrolla con la obtención de corteza cerebral de embriones de 17 días de preñez de ratas Wistar. Las células cultivadas después de 72 horas de la extracción de la corteza se dividieron en dos grupos, a uno de ellos se le administró eritropoyetina alfa a una concentración de 30 pM y el otro era el grupo control. A los dos grupos de células se les radió con 6 Gy mediante un aparato Phoenix. Tras la radioterapia permanecieron 24 horas en la incubadora antes de fijarlas. Las células fueron fijadas con formaldehído al 4%. A continuación, con la técnica de TUNEL, se valoró el número de células apoptóticas en los cultivos radiados.

Resultados. Se observó un porcentaje de apoptosis del 25,22% del grupo de cultivo sin eritropoyetina, mientras que en el grupo de células radiadas con eritropoyetina fue del 15,5%. Las variables cuantitativas se analizaron mediante el test *t* de Student y el resultado de la comparación entre los dos grupos fue estadísticamente significativo ($p < 0,0001$).

Conclusión. En nuestro modelo experimental *in vitro* se comprobó que la eritropoyetina es eficaz en la prevención de la apoptosis en células del sistema nervioso central de ratas por radiación. Esto abre nuevos campos para la investigación del efecto protector del sistema nervioso.

Palabras clave. Eritropoyetina. Estudio *in vitro*. Radioterapia.

Servicio de Neurocirugía (A. Gómez-De la Riva, A. Isla-Guerrero); Servicio de Oncología Radioterápica (A. García-Grande). Hospital Universitario La Paz. Madrid, España.

Correspondencia:

Dr. Álvaro Gómez de la Riva. Servicio de Neurocirugía. Hospital Universitario La Paz. Paseo de la Castellana, 261. E-28046 Madrid.

E-mail:

gomeznarro33@hotmail.com

Aceptado tras revisión externa:

22.05.13.

Cómo citar este artículo:

Gómez-De la Riva A, Isla-Guerrero A, García-Grande A. La eritropoyetina como factor de protección de la radioterapia sobre células del sistema nervioso central. Estudio *in vitro*. Rev Neurol 2014; 58: 199-206.

© 2014 Revista de Neurología

Introducción

La irradiación empleada en el tratamiento de los tumores o malformaciones vasculares del sistema nervioso central (SNC) presenta gran riesgo de lesionar los tejidos sanos adyacentes. Los daños producidos por la radioterapia sobre el SNC es el principal factor que limita este tratamiento, ya que existe una relación estrecha entre el grado de dosis empleada y la duración de la irradiación con el grado de destrucción perilesional.

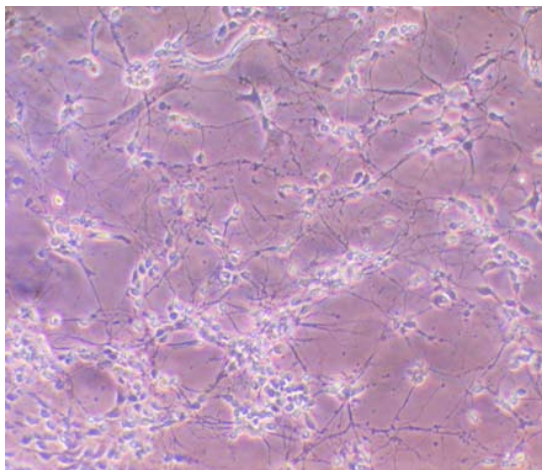
Los tejidos normales están formados por diferentes células que dependen del tejido vascular para su integridad funcional. Cuando un tejido es irradiado, en primer lugar se observa una disminución del número de mitosis debido a la inhibición del proceso proliferativo. Al mismo tiempo, pueden observarse aberraciones cromosómicas en aquellas células que se estaban dividiendo en el momento del tratamiento. Más tarde aparecerán microhemorragias, edema celular e intersticial y necrosis. Las microhemorragias y el edema intersticial son secundarios a la acción de las radiaciones sobre el lecho vascular, mientras que el edema celular indica lesión irreversible de la célula. Luego, las células ac-

tivas desde el punto de vista de la mitosis desaparecen y se encuentran fagocitos que retiran los restos de las células muertas, así se inicia la reparación del daño radioinducido. Primero, aparecen células indiferenciadas, que proliferan para sustituir a las células desaparecidas. En esta fase, se pueden seguir viendo mitosis aberrantes hasta que el tejido se repuebla en su totalidad. Sin embargo, a más largo plazo, si el lecho conectivo-vascular no ha recuperado la integridad funcional, y no es capaz de aportar oxígeno y nutrientes necesarios al tejido, pueden aparecer cambios degenerativos (atrofia) en el tejido noble [1].

El SNC está constituido básicamente por neuronas, células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía), células ependimarias y células del endotelio vascular. Cada tipo celular posee una tarea especial en el funcionamiento del SNC y una respuesta a la irradiación establecida por las características histológicas. Las lesiones originadas por la irradiación del SNC afectan principalmente a las células que componen la glía y las células del endotelio vascular [2].

Los oligodendrocitos (cuya función es la formación y el mantenimiento de la vaina de mielina) son

Figura 1. Imagen microscópica (20×) de células de corteza cerebral de embriones de rata tras la siembra en los portas.



las células con mayor grado de afectación. Las neuronas, en cambio, son más radiorresistentes por su alto grado de diferenciación celular y porque han perdido la capacidad de reproducirse [3]. Los astrocitos pueden proteger a las neuronas al captar el glutamato extracelular y evitar su toxicidad [3].

Los cambios morfológicos producidos por la irradiación sobre el SNC consisten en una desmielinización producida por la muerte de los oligodendrocitos, asociada a áreas de edema, con posterior formación de malacia y atrofia cerebral [2,4].

La muerte celular causada por la irradiación se produce por dos mecanismos: apoptosis y necrosis celular [5]. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada por el que el ADN sufre una rotura de su cadena y una degeneración de la estructura molecular a consecuencia de un daño cromosómico irreparable [6]. La necrosis es un proceso distinto, donde la muerte celular se produce por una hinchazón de la célula y de sus organelas, con la ruptura de la membrana celular antes de la degradación del ADN [7,8].

Conocido es que la eritropoyetina (EPO), hormona glucoproteica de 34 kDa, que se produce principalmente en los riñones, tiene un papel importantísimo en la eritropoyesis y se produce en respuesta ante la hipoxia [9,10]. La eritropoyetina alfa es una forma recombinante con actividades idénticas para el uso terapéutico [11]. Estudios recientes han demostrado efectos protectores de la eritropoyetina sobre el SNC ante la isquemia cere-

bral o en otras agresiones como traumatismos craneoencefálicos. Se considera que puede tener un efecto beneficioso sobre el traumatismo craneoencefálico, trastornos como la esclerosis múltiple o la enfermedad de Parkinson, y lesiones isquémicas o infartos [12-15].

El objetivo de este estudio es observar si la eritropoyetina tiene efectos protectores, sobre células del SNC, cuando se les aplica una dosis de radiación que en condiciones normales causaría un elevado número de muerte celular (apoptosis).

Materiales y métodos

Cultivo celular

El estudio se desarrolló primero con la obtención de cortezas cerebrales de embriones de ratas Wistar en el 17.º día de preñez mediante una incisión abdominal en condiciones de esterilidad. El encéfalo de los embriones de 18 días se expuso, después de quitar la piel y el cráneo, y se separó el tronco encefálico del cerebro. A continuación, se separaron los hemisferios cerebrales y se limpiaron de meninges. Por último, la corteza se separó de la parte ventral y se recogió en HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , y a continuación se pasaron a un tubo de plástico de 15 mL, donde se llevó a cabo una digestión enzimática. La digestión se realizó con una mezcla de 0,7 mg/mL de tripsina, 3 mg/mL de albúmina de suero bovina y 100 mg/mL DNasa en 1 mL de HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} durante 15 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se inactivó la tripsina a temperatura ambiente mediante la adición de inhibidor de tripsina de soja a una concentración final de 500 µg/mL. Los fragmentos de tejido obtenidos tras la digestión se disociaron mecánicamente hasta tener una suspensión de células, que se recuperaron mediante centrifugación a 200 g, durante 10 minutos. Después, se resuspendió el sedimento de células resultante en medio de cultivo D/F-10S (DMEM/F12-10 % suero fetal bovino).

Tras llevar a cabo un recuento del número de células viables presentes en la dispersión, se realizó un segundo lavado, por centrifugación a 200 g y resuspensión en medio de cultivo, se ajustó el volumen para obtener la densidad adecuada de siembra (30.000 células/cm²). Las células se sembraron sobre portas de vidrio con pocillos recubiertos previamente con polilisina (PLL, 10 µg/mL, Sigma) (Fig. 1). Se dejaron en el incubador durante una hora en medio con suero a una temperatura de 37 °C y una atmósfera húmeda que contenía el 95% de oxígeno

Figura 2. Imagen microscópica tras la técnica de TUNEL del grupo control o grupo EPO negativo.

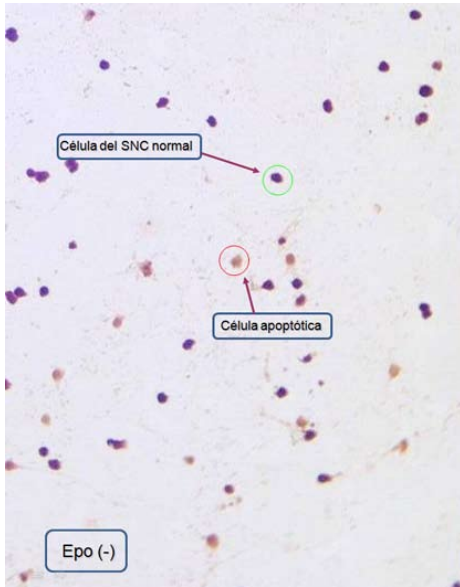
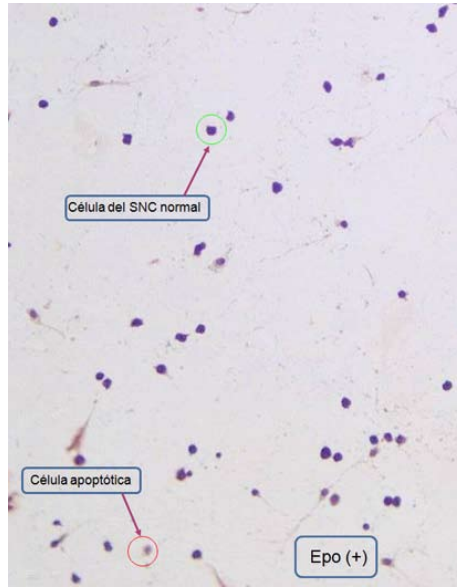


Figura 3. Imagen microscópica tras la técnica de TUNEL del grupo EPO positivo.



y el 5% de CO₂. Una vez que las células se habían adherido, se retiró el medio D/F-10S, se sustituyó por el medio D/F con B27 (Gibco) y se introdujeron de nuevo en el incubador.

Pasadas 72 horas, se cambió el medio por otro similar en un cubre (grupo control o grupo EPO negativas), mientras que en el otro cubre se añadió al medio eritropoyetina alfa con concentración 30 pM (EPO positivas). Los cultivos permanecieron, con posterioridad, 24 horas en el incubador.

Radioterapia

Las células recibieron 5 Gy mediante un aparato Phoenix (unidad de telecobaltoterapia de fotones de 1,25 MVI). Tras la radioterapia, permanecieron 24 horas en el incubador antes de fijarlas.

Apoptosis

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4%. Luego, por medio de la técnica de TUNEL (*Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) se valoró el número de células apoptóticas en los cultivos irradiados. Esta técnica consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con biotina en los grupos hidroxilos (3'OH) terminales que han quedado ex-

puestos durante el proceso de fragmentación de la doble cadena de ADN por la activación de la endonucleasa endógena. La enzima transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT), que sintetiza un polímero de dUTP-biotina (que a su vez se reconoce por el conjugado proteico avidina-peroxidasa y visualizado por una reacción con peróxido de hidrógeno y el cromóforo 3-amino-9-etil-carbanzol, AEC) utiliza este grupo como sustrato.

Por medio de esta técnica, los núcleos apoptóticos se tiñen de color café rojizo y se visualizan fragmentos del núcleo condensado en la periferia de la célula (TUNEL positivo). Las células que no presentan apoptosis se tiñen de color verde (TUNEL negativo) y se facilita la comparación entre ambos grupos de células (Figs. 2 y 3).

Recuento de células

Tras la tinción con TUNEL, las células se cuentan mediante el microscopio (×20) y el programa informático Image-Pro-Plus 5 (Figs. 2 y 3), que contabiliza el número de células apoptóticas con respecto al total de las células en determinados campos microscópicos (por ejemplo, en el campo microscópico 1 del grupo control se observaron 150 células, de las que 35 eran apoptóticas) (Tabla).

Resultados

Una vez obtenida la comparación entre las células totales y las apoptóticas, se observa un total de 6.875 células, en el grupo control, de las que 1.734 células son apoptóticas; mientras tanto, en el grupo EPO positivo, se observa un total de 6.039 células de las que 936 son apoptóticas. Este hecho supone un porcentaje de apoptosis del 25,22% en el grupo de control o grupo EPO negativo; mientras que en el grupo EPO positivo se ve un porcentaje de apoptosis del 15,5%. Esto supone una disminución de la apoptosis, producida por una irradiación de 5 Gy, en cultivos celulares de corteza cerebral de embriones de rata tratados con eritropoyetina alfa.

Estudio estadístico

Las variables cuantitativas se analizaron mediante el test *t* de Student para el contraste de dos medias independientes analizando las diferencias significativas entre variables, siempre que $p < 0,05$. El resultado de la comparación entre las células totales y las apoptóticas, analizado mediante la *t* de Student, muestra un resultado estadísticamente significativo ($p < 0,0001$).

Discusión

Se entiende que un fármaco radioprotector son aquellas sustancias químicas que actúan disminuyendo la eficacia de las radiaciones en el tejido sano. La condición indispensable que deben cumplir estas sustancias es que deben encontrarse en el interior de la célula en el momento en el que ésta reciba la radiación.

Hoy en día, se usan corticoides para tratar de controlar el edema, agudo o tardío, del SNC causado por la radiación. Sin embargo, en ocasiones no es posible controlarlo, principalmente en tumores malignos, y su efecto es temporal.

El uso de la eritropoyetina en el cáncer, tradicionalmente, se ha basado en la corrección de la anemia, que éste produce por mecanismos como la infiltración sobre la médula ósea, la pérdida de sangre, la hemólisis, alteraciones endocrinas o hepáticas, pero sobre todo se produce por una interacción compleja entre el tumor y el sistema inmune por la producción de citocinas [16,17].

Se han emprendido estudios sobre animales de experimentación con el fin de investigar la relación de la anemia, su corrección con la eritropoyetina y la sensibilidad a la radiación sobre tumores como

sarcomas [18] o glioblastomas [19]. Concluyen que existe una mayor respuesta a la radiación en los tumores de los animales anémicos que reciben eritropoyetina. Esto se debe a que la hipoxia producida por una anemia produce cierto grado de radiorresistencia, que se mejora con la administración de eritropoyetina al elevar el hematocrito.

Se ha comprobado que la eritropoyetina se produce por el tejido cerebral (astrocitos y neuronas). Esta producción aumenta en respuesta ante la hipoxia o isquemia. Esta eritropoyetina interactúa con receptores específicos de las neuronas e incrementa la tolerancia ante la hipoxia, lo que sugiere su participación en un sistema neuroprotector endógeno en el cerebro [20-23]. Otros mecanismos que también pueden inducir su producción son la hipoglucemia o una fuerte depolarización neuronal [24]. También se han observado abundantes receptores para la EPO en capilares de la sustancia blanca o en astrocitos que rodean a estos capilares, lo que sugiere la posibilidad de un transporte (transcitosis) a través de la barrera hematoencefálica intacta [25]. Estudios posteriores en animales confirman esta hipótesis [26].

Aunque todavía se investiga el mecanismo neuroprotector de la eritropoyetina, se plantea que su acción está mediada por receptores que se encuentran en las paredes del endotelio vascular y en los astrocitos [27,28]. Los mecanismos de la EPO como agente neuroprotector parecen ser multifactoriales. La EPO puede producir de manera indirecta un efecto neuroprotector para restablecer el suministro de sangre al tejido dañado o actuar directamente sobre las neuronas por activación de numerosas vías de señalización molecular. Sobre la célula neuronal, la eritropoyetina produce un aumento rápido de la concentración de calcio libre intracelular [29-31], lo que incrementa la síntesis de monoaminas y óxido nítrico (ON) [25,30], y la depolarización de la membrana neuronal. La EPO también tiene un efecto antioxidante al reducir los radicales libres [32,33]. Su acción antioxidante también se sustenta en el restablecimiento de las actividades de la catalasa citosólica y la glutatión peroxidasa en eritrocitos, lo que protege contra el estrés oxidativo por la reducción de la peroxidación lipídica [32]. Otra función de la eritropoyetina es reducir el daño causado por el glutamato [34,35]. También ejerce una función antiapoptótica que regula la expresión de genes implicados en la apoptosis, se ha relacionado con la inhibición de la cascada de las caspasas [36] y con un aumento del bcl-XL (antiapoptótico) y una disminución del gen *bak* (proapoptótico), lo que produce una disminución de la apoptosis y un aumento

de la supervivencia neuronal [37-39]. Se ha demostrado que también tiene actividad neurotrófica, lo que implica un efecto de mayor latencia que la inhibición de la apoptosis [14]. Tiene funciones sobre la estimulación de la neovascularización o angiogénesis como respuesta a la hipoxia y al daño neuronal al estimular la formación de microvasos mediante la interacción con su receptor en los vasos sanguíneos [27,40,41]; sobre la capacidad de regulación de las células madre, puede regular la producción de progenitores de células neuronales [42], y sobre las citocinas proinflamatorias, las reduce y produce un efecto antiinflamatorio que disminuye la migración de células inflamatorias [43,44].

Se han iniciado diferentes estudios en animales de experimentación con el fin de observar el efecto neuroprotector de la eritropoyetina ante agresiones sobre el sistema nervioso como traumatismos o isquemia tanto cerebral como en la médula espinal [28,44-55]. Los resultados de estos estudios muestran un efecto neuroprotector del tejido neuronal de la eritropoyetina, lo que reduce la apoptosis, el infiltrado inflamatorio por la reducción de citocinas inflamatorias, el edema, el vasoespasmo y mejora la vasorregulación y estimula la angiogénesis.

Sobre humanos con infarto cerebral no hemorrágico, Ehrenreich et al han emprendido un estudio por el que administran eritropoyetina, dentro de las primeras ocho horas desde el inicio de los síntomas, para ver el resultado funcional. Los autores han observado una reducción significativa del área infartada en los pacientes tratados con EPO, asociada con una notable recuperación neurológica y una mejoría clínica un mes después de la isquemia [56]. La inconveniencia de este estudio es el bajo tamaño de la muestra. El incremento de los niveles de eritropoyetina en suero y en líquido cefalorraquídeo sugiere que cruza la barrera hematoencefálica dañada y protege del daño isquémico cerebral.

Un estudio con asialoeritropoyetina (una variante de la eritropoyetina) muestra efectos neuroprotectores beneficiosos en ensayos con animales de experimentación, sobre lesiones en la médula espinal, el nervio ciático y sobre infartos y lesiones isquémicas cerebrales [57]. Además, no produce elevación del hematocrito y elimina los posibles efectos secundarios de la administración de eritropoyetina (poliglobulia [58], trombosis por hiperreactividad plaquetaria [59]).

Es bien conocida la presencia de anemia en los pacientes con cáncer y es frecuente el uso de la eritropoyetina en pacientes que reciben quimioterapia o radioterapia, lo que mejora sus resultados en cuanto a la supervivencia, la calidad de vida y la

Tabla. Número de células por campo en el grupo control (o grupo EPO negativas) y en el grupo EPO positivas.

	Grupo control		Grupo EPO positivas	
	Total (n = 6.875)	Apoptosis (n = 1.734)	Total (n = 6.039)	Apoptosis (n = 936)
Campo 1	150	35	47	11
Campo 2	176	42	198	33
Campo 3	176	72	220	43
Campo 4	207	46	53	9
Campo 5	179	52	168	28
Campo 6	170	61	130	10
Campo 7	189	37	118	19
Campo 8	244	50	196	34
Campo 9	448	107	327	56
Campo 10	215	80	242	30
Campo 11	135	53	156	24
Campo 12	652	156	176	21
Campo 13	293	47	547	138
Campo 14	555	115	181	19
Campo 15	299	64	579	71
Campo 16	326	111	240	34
Campo 17	564	121	178	47
Campo 18	219	50	155	27
Campo 19	275	86	228	13
Campo 20	261	83	293	53
Campo 21	188	59	447	68
Campo 22	84	23	83	10
Campo 23	272	58	478	43
Campo 24	314	70	166	30
Campo 25	284	56	433	65

respuesta al tratamiento [60-63]. En tumores como el cáncer pulmonar de células pequeñas, está establecida la utilidad de la radiación profiláctica del

SNC para evitar las metástasis frecuentes que se producen, con el daño que puede originar la radioterapia sobre las células nerviosas.

Un estudio experimental sobre los efectos de la radioterapia combinada con la temozolamida sobre células de glioblastoma implantadas en ratones demostró un aumento de la supervivencia sin alterar el crecimiento celular ni la migración. Sin embargo, podría producir una protección de las células tumorales ante la radioterapia y la quimioterapia, por lo que concluyen que no debería administrarse [64].

Basándonos en los estudios llevados a cabo, en los que se ha observado la capacidad de neuroprotección de la eritropoyetina, hemos emprendido un estudio *in vitro* para analizar si el efecto neuroprotector de la eritropoyetina se extiende a la protección contra la radioterapia. En nuestro modelo experimental *in vitro*, se comprobó la eficacia de la eritropoyetina alfa en la prevención de la apoptosis, en células del SNC de ratas, producida por la radiación. Esto abre nuevos campos para la investigación del efecto neuroprotector de la eritropoyetina y sus derivados sobre el sistema nervioso. Actualmente, estamos desarrollando un modelo experimental en ratas para el estudio *in vivo*.

Bibliografía

- Isla A, Budke M, Cacicedo L, García-Grande A, Vázquez-Rodríguez I, De Miguel E, et al. Efecto protector de la hormona de crecimiento en cultivos de células del sistema nervioso central. *Rev Neurol* 2002; 34: 208-11.
- Schultheiss TE, Kun LE, Ang KK, Stephens LC. Radiation response of the central nervous system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 1093-112.
- Noel F, Tofilon PJ. Astrocytes protect against X-ray-induced neuronal toxicity in vitro. *Neuroreport* 1998; 9: 1133-7.
- Li YQ, Jay V, Wong CS. Oligodendrocytes in the adult rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1996; 56: 5417-22.
- Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 781-96.
- Harms-Ringdahl M, Nicotera P, Radford IR. Radiation induced apoptosis. *Mutat Res* 1996; 366: 171-9.
- Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLoughlin M, Ehleiter D, Schwartz JL, et al. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1994; 54: 2582-90.
- Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6: 41-4.
- Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77: 419-34.
- Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem* 1992; 210: 649-63.
- Egrie JC, Strickland TW, Lane J, Aoki K, Cohen AM, Smalling R, et al. Characterization and biologic effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology* 1986; 172: 213-24.
- Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M, et al. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 195-206.
- Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res* 2004; 1000: 19-31.
- Olsen NV. Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (Suppl 4): S323-30.
- Smith RE Jr. Erythropoietic agents in the management of cancer patients. Part 2: studies on their role in neuroprotection and neurotherapy. *J Support Oncol* 2004; 2: 39-49.
- Birgegard G, Aapro MS, Bokemeyer C, Dicato M, Drings P, Hornedo J, et al. Cancer-related anemia: pathogenesis, prevalence and treatment. *Oncology* 2005; 68 (Suppl 1): 3-11.
- Mercadante S, Gebbia V, Marrazzo A, Filosto S. Anemia in cancer: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev* 2000; 26: 303-11.
- Stuben G, Pottgen C, Knuhmann K, Schmidt K, Stuschke M, Thews O, et al. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in radiosensitivity of experimental human tumors in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55: 1358-62.
- Stuben G, Thews O, Pottgen C, Knuhmann K, Sack H, Stuschke M, et al. Impact of anemia prevention by recombinant human erythropoietin on the sensitivity of xenografted glioblastomas to fractionated irradiation. *Strahlenther Onkol* 2003; 179: 620-5.
- Bernaudo M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, et al. Neurons and astrocytes express brain EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30: 271-8.
- Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, et al. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 81: 29-42.
- Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Siren AL, et al. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 2000; 11: 3485-8.
- Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 11208-16.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11715-20.
- Broadwell RD. Endothelial cell biology and the enigma of transcytosis through the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol* 1993; 331: 137-41.
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, De Lanerolle NC, Cerami C, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10526-31.
- Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305: 239-42.
- Catania MA, Crupi A, Firenzuoli F, Parisi A, Sturiale A, Squadrito F. Oral administration of a soy extract improves endothelial dysfunction in ovariectomized rats. *Planta Med* 2002; 68: 1142-4.
- Jumbe NL. Erythropoietic agents as neurotherapeutic agents: what barriers exist? *Oncology (Williston Park)* 2002; 16 (Suppl 10): 91-107.
- Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem* 1999; 72: 2565-72.
- Kawakami M, Iwasaki S, Sato K, Takahashi M. Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 293-7.
- Chattopadhyay A, Choudhury TD, Bandyopadhyay D, Datta AG. Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 419-25.
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4635-40.
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents

- in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76: 105-16.
35. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem* 2001; 276: 39469-75.
 36. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1107-18.
 37. Renzi MJ, Farrell FX, Bittner A, Galindo JE, Morton M, Trinh H, et al. Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; 104: 86-95.
 38. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX, Nakata K, Ma YJ, et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res* 2002; 67: 795-803.
 39. Brines M. What evidence supports use of erythropoietin as a novel neurotherapeutic? *Oncology (Williston Park)* 2002; 16 (Suppl 10): 79-89.
 40. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci* 2000; 15: 225-9.
 41. Yamaji R, Okada T, Moriya M, Naito M, Tsuruo T, Miyatake K, et al. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996; 239: 494-500.
 42. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001; 21: 9733-43.
 43. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002; 952: 128-34.
 44. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 2003; 198: 971-5.
 45. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konak S, Ulukuc C, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2258-63.
 46. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4044-9.
 47. Grasso G, Buemi M, Alafaci C, Sfacteria A, Passalacqua M, Sturiale A, et al. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5627-31.
 48. Belayev L, Khoutorova L, Zhao W, Vigdorchik A, Belayev A, Busto R, et al. Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2005; 36: 1071-6.
 49. Bianchi R, Brines M, Lauria G, Savino C, Gilardini A, Nicolini G, et al. Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental cisplatin peripheral neurotoxicity. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2607-12.
 50. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, et al. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 2006; 129 (Pt 2): 480-9.
 51. Springborg JB, Ma X, Rochat P, Knudsen GM, Amtorp O, Paulson OB, et al. A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 823-9.
 52. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10659-64.
 53. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9450-5.
 54. Grasso G, Sfacteria A, Erbayraktar S, Passalacqua M, Meli F, Gokmen N, et al. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *J Neurosurg Spine* 2006; 4: 310-8.
 55. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, et al. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006; 172: 27-37.
 56. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Ceppek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8: 495-505.
 57. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6741-6.
 58. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 857-64.
 59. Wun T, Law L, Harvey D, Sieracki B, Scudder SA, Ryu JK. Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin. *Cancer* 2003; 98: 1514-20.
 60. Henke M, Guttenberger R, Barke A, Pajonk F, Potter R, Frommhold H. Erythropoietin for patients undergoing radiotherapy: a pilot study. *Radiother Oncol* 1999; 50: 185-90.
 61. Seidenfeld J, Piper M, Flamm C, Hasselblad V, Armitage JO, Bennett CL, et al. Epoetin treatment of anemia associated with cancer therapy: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1204-14.
 62. Shasha D, Harrison LB. Anemia treatment and the radiation oncologist: optimizing patient outcomes. *Oncology (Williston Park)* 2001; 15: 1486-91.
 63. Rades D, Tribius S, Yekebas EF, Bahrehmand R, Wildfang I, Kilic E, et al. Epoetin alfa improves survival after chemoradiation for stage III esophageal cancer: final results of a prospective observational study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 459-65.
 64. Hassouna I, Sperling S, Kim E, Schulz-Schaeffer W, Rave-Fränk M, Hasselblatt M, et al. Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72: 927-34.

Erythropoietin as a protective factor in rat CNS cells receiving radiotherapy –an in vitro study

Aim. To investigate the effect of erythropoietin in cultured rat cerebral cortex cells receiving radiotherapy.

Materials and methods. Cerebral cortex was taken from 17-day-old Wistar rat embryos and placed in culture. At 72 hours, the cultures were divided into two groups, one receiving 30 pM erythropoietin alpha and the other was the control group. Both groups received 6 Gy from a Phoenix apparatus and were incubated for another 24 hours before fixation in 4% formaldehyde. TUNEL technique was employed to calculate the number of apoptotic cells in the irradiated cultures.

Results. Apoptosis affected 25.22% of the cells cultured without erythropoietin and 15.5% in the group receiving erythropoietin. Student's *t*-test was used to analyse quantitative variables and showed a significant difference in apoptosis between the two groups ($p < 0.0001$).

Conclusion. Our in vitro experimental model demonstrated that erythropoietin effectively prevents apoptosis in irradiated rat SNC cells, opening new fields for investigation into protective agents for the nervous system.

Key words. Erythropoietin. In vitro study. Radiotherapy.