

## Evidencias de seguridad y eficacia de la Neuro-EPO intranasal y EPOCIM intraperitoneal en un modelo animal no transgénico de la enfermedad de Alzheimer

Autores:

María García Barceló<sup>1</sup>, Yamila Rodríguez Cruz<sup>2</sup>, Consuelo González Triana<sup>3</sup>, Maurice Tangui<sup>4</sup>, Julio César García Rodríguez<sup>5</sup>

1 Master, Profesora Auxiliar, ICBP Victoria de Girón, Habana, Cuba.

2 Asistente de Histología, ICBP Victoria de Girón, Habana, Cuba.

3 Investigador Auxiliar, CENPALAB, Habana, Cuba

4 Doctor en Ciencias, Profesor Titular, Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia

5 Doctor en Ciencias, Profesor Titular, Oficina del Asesor Científico, Consejo de Estado, Habana, Cuba

Correo electrónico: mariagarcia@infomed.sld.cu

### RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en los adultos mayores. En el presente trabajo nos proponemos determinar el efecto de las formulaciones de Neuro-EPO por vía intranasal e intraperitoneal sobre la sobrevivencia, la eritropoyesis y la estructura histológica de los cerebros en un modelo animal no transgénico de la enfermedad de Alzheimer (EA). El modelo fue inducido mediante la inyección intracerebroventricular (ICV) del péptido amiloide  $\text{A}\beta_{25-35}$  y como control se utilizó la inyección ICV de la secuencia inversa  $\text{A}\beta_{35-25}$  del péptido beta amiloide, los que fueron administrados el día 0. Entre los días 1 y 4 los ratones recibieron vehículo o rHuEPO intraperitoneal una vez al día o vehículo o Neuro-EPO tres veces al día por vía intranasal según el grupo experimental. Se evaluó la sobrevivencia y a los 7 días los ratones fueron sacrificados y se realizó un estudio histológico mediante la técnica de inclusión en parafina. Se analizó además, el conteo de reticulocitos. Todos los animales permanecieron con vida hasta finalizar el experimento y se encontró una mayor formación de reticulocitos en el grupo lesionado donde se utilizó la vía intraperitoneal. Se observó una disminución de las células en la región CA1 y CA3 del hipocampo en los ratones lesionados con administración de Vehículo intranasal comparados con los ratones lesionados con administración de Neuro-EPO intranasal, lo que sugiere el efecto neuroprotector de la Neuro-EPO administrada.

**PALABRAS CLAVE:** Alzheimer, Neuro-EPO, EPOCIM, intranasal, intraperitoneal, cerebros.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) constituye un problema de salud a nivel mundial y constituye la causa más común de demencia, incurable y terminal en los adultos mayores. En estos momentos no existe una terapéutica específica y validada que permita mitigar el efecto devastador de esta enfermedad.

La EA se manifiesta como un deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que lentamente se deterioran las células nerviosas en diversas zonas de la corteza cerebral, así como algunas estructuras circundantes, dañando así las capacidades de la persona de controlar las emociones, reconocer errores, coordinar los movimientos y recordar; provocando finalmente la perdida de toda la memoria y funcionamiento mental.

La EA representa una verdadera entidad neurodegenerativa que por lo general, el síntoma inicial es la inutilidad de adquirir nuevas memorias, pero suele confundirse con actitudes relacionadas con la vejez o al estrés. Sus causas aún permanecen desconocidas, aunque existen diferentes factores e hipótesis que pretenden explicar el fenómeno <sup>1</sup>.

Constituye en la actualidad la cuarta causa principal de muerte en los adultos y, a menos que se desarrollen métodos eficaces para la prevención y el tratamiento, la enfermedad de Alzheimer alcanzará proporciones epidémicas para mediados del siglo.

En Cuba el envejecimiento de la población nos llevará en los próximos años a que un 25% de nuestro pueblo sea adulto de la tercera o cuarta edad <sup>2</sup>. Por tanto, la aparición de las demencias y entre ellas la enfermedad de Alzheimer tendrán un notable incremento en el cuadro de salud de la población cubana, situación que tendrá un negativo impacto en la calidad de vida de la población así como un incremento en el presupuesto de los gastos de salud, por concepto de su atención especializada por invalidez. Esta situación la presentan también los países industrializados, para los cuales constituye un reto actual de las neurociencias encontrar terapéuticas seguras y eficaces. Paradójicamente, nuestro país se encuentra en similar situación con el agravante de no disponer de la economía de los industrializados. No obstante, esta realidad nos lleva a buscar soluciones contra

el deterioro cognitivo que genera esta enfermedad, para lo cual debemos profundizar en su estudio y en las posibilidades terapéuticas actuales y futuras, para obtener conocimientos más específicos de cómo actuar frente a esta enfermedad y mejorar así el manejo y la calidad de vida de estos pacientes.

El empleo de moléculas recombinantes humanas obtenidas a través de la biotecnología con actividad terapéutica es una creciente línea de investigación en neurociencias. Un ejemplo de este tipo de moléculas es la eritropoyetina (EPO), que es una glicoproteína que se produce fundamentalmente en el riñón y está involucrada en la proliferación, diferenciación y maduración de los eritrocitos y otras células hematopoyéticas, aumentando el suministro de oxígeno a los tejido<sup>3,4</sup>.

Se conoce que con el transcurso de los años se incrementan los niveles de EPO en el líquido cefalorraquídeo<sup>5</sup>, desarrollándose una correlación positiva con la edad<sup>6</sup>, lo que puede ser interpretado como una respuesta fisiológica de neuroprotección endógena. Sin embargo en diferentes enfermedades neurodegenerativas ésta correlación se ve afectada como en la Ataxia SCA-2; resultados preliminares indican disminución significativa de EPO en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes<sup>5</sup>. Diversos estudios plantean que la alteración de la homeostasis de esta proteína puede jugar un deletéreo papel en diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer<sup>7</sup>.

Resultados alcanzados recientemente, han demostrado preclínicamente en un modelo no transgénico de la enfermedad de Alzheimer el efecto neuroprotector de una formulación nasal de la EPO con bajo contenido de ácido siálico cuyo principio activo es la Neuro-EPO. La Neuro-EPO fue capaz de proteger a los animales del efecto amnésico producido por la aplicación intracerebroventricular del neuropéptido del beta amiloide 25-35<sup>8</sup>. Esta evidencia experimental se corresponde con otros estudios donde se postulan el posible efecto neuroprotector de la EPO en esta enfermedad<sup>9</sup>.

La Neuro-EPO es producida por el Centro de Inmunología Molecular y se dispone de propiedad intelectual sobre este novedoso producto, requisito indispensable para, una vez registrada y demostrada su eficacia y seguridad en la clínica, comercializarse como un nuevo producto de la industria biotecnológica de Cuba. La formulación nasal de Neuro-EPO es preparada en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos patente de nuestro país<sup>10</sup>.

En el presente año se proponen desarrollar nuevos estudios preclínicos del uso de

la Neuro-EPO para el tratamiento preventivo y crónico de la isquemia cerebral y en modelos no transgénico y transgénicos de la enfermedad de Alzheimer que permitan confirmar los parámetros de seguridad y eficacia.

Actualmente no se ha establecido una metodología para la evaluación de neuroprotectores, ni para medicamentos que tengan acceso por la vía nasal al SNC, por lo que al ser esta formulación nasal Neuro-EPO un nuevo producto, con una nueva indicación y vía de aplicación, se hace necesario establecer según requisitos de las autoridades regulatorias, los niveles de eficacia y de seguridad preclínicas en diversos modelos de animales como los de Alzheimer, lo cual constituye un requisito previo para su evaluación en ensayos clínicos en humanos.

Teniendo en cuenta todos estos elementos, suponemos que la EPO endógena cerebral tiene funciones de neuroprotección así como de neuroplasticidad por lo que consideramos que la aplicación de Neuro-EPO favorece los mecanismos de neuroprotección endógena que contribuyen a mantener y/o restaurar la homeostasis de esta proteína, mejorando las alteraciones neurológicas de animales con enfermedad de Alzheimer.

#### OBJETIVOS:

Determinar el efecto de la Neuro-EPO por vía intranasal y la EPOCIM intraperitoneal sobre la sobrevivencia en un modelo animal no transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

Identificar el efecto de la Neuro-EPO por vía intranasal y la EPOCIM intraperitoneal en la eritropoyesis en un modelo animal no transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

Caracterizar el efecto de la Neuro-EPO por vía intranasal y la EPOCIM intraperitoneal en la estructura histológica de los cerebros en un modelo animal no transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

##### Animales

Para el modelo no transgénico de la enfermedad de Alzheimer se utilizaron ratones C57Bcl/6 masculinos de 5 semanas, con un peso entre  $25 \pm 2$  g. El modelo no transgénico de enfermedad de Alzheimer a utilizar fue inducido por la inyección intracerebroventricular (ICV) del péptido amiloide  $A\beta_{25-35}$  (9 nmol/ratón) y como control se utilizaron animales a los que se les inyectó ICV la secuencia inversa  $A\beta_{35-25}$  del péptido beta amiloide (Sc.A $\beta$ , 9 nmol/ ratón), según el método descrito <sup>11</sup>.

Los animales fueron obtenidos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Los animales fueron mantenidos en el área de experimentación animal de Aseguramiento de la Calidad del CENPALAB con las condiciones controladas de temperatura, humedad, iluminación, ventilación, ruido y cantidad de animales por unidad de área. El ensayo fue conducido y regido por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación en el CENPALAB, Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico, de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiente, así como los Procedimientos Operacionales de Trabajo establecidos para el desarrollo de todas las actividades en el CENPALAB.

Los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento (Fórmula EMO: 1002, peletizado, esterilizable) y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. El protocolo de trabajo fue analizado y aprobado por el Comité de Ética Institucional, considerando las declaraciones internacionales establecidas por el ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources) <sup>12</sup>.

#### Formulación nasal de Neuro-EPO

La formulación nasal de Neuro-EPO es preparada en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos de nuestro país <sup>10</sup>. Se emplea el polímero bioadhesivo D-hidroxi-propilcelulosa, para aumentar el tiempo de residencia en la cavidad nasal y disminuir su eliminación por el movimiento ciliar. Otros excipientes para la estabilidad de la formulación son: buffer para estabilizar el pH, preservante para evitar la contaminación microbiológica e isotonizante para regular la presión osmótica. En lo adelante las referencias al vehículo incluyen todos los componentes de la formulación excepto la Neuro-EPO. La formulación de referencia de EPOhr comercial (EPOCIM) fue suministrada generosamente por el Centro de Inmunología Molecular (CIM, La Habana, Cuba).

#### Métodos

##### Administración intranasal de la Neuro-EPO y de la EPOhr por vía intraperitoneal:

Se aplicó la vía intranasal (IN) como está establecido en las Guías para cuidado y uso de los animales de laboratorio <sup>12</sup>. Se aplicó la sujeción del animal, se colocó en decúbito supino y con una pipeta automática se aplicaron las dosis de cada protocolo en cada fosa nasal de forma lenta esperando que cada gota sea adsorbida lentamente por los animales, se tapó la boca para que el animal respirara por la nariz y absorbiera toda la aplicación, el tiempo de aplicación fue de 1 a 2 minutos.

La inyección intracerebroventricular (ICV) del péptido amiloide se realizó el día 0 y la administración de EPOCIM o vehículo por vía intraperitoneal se realizó una vez al día durante los días 1 al 4 después de la inyección del péptido a una dosis de 500 µg/kg. La Neuro-EPO o vehículo por vía intranasal se administró a una dosis de 125 µg/kg, tres veces al día durante los días 1 al 4 después de la inyección del péptido.

#### Distribución de animales por grupos

Se utilizaron un total de 54 animales con los que se confeccionaron de forma aleatoria 8 grupos, 4 grupos controles, 4 experimentales y un grupo denominado control sano al que no se le realizó ningún proceder. Quedando los animales distribuidos de la siguiente forma:

Grupo	Caracterización	Vía de administración	Dosis	Cantidad de animales
I	Control (Inyección ICV la secuencia inversa A $\beta$ <sub>35-25</sub> del péptido beta amiloide)	Solución salina intraperitoneal	500 µg/kg una dosis diaria durante 4 días	6
II	Control (Inyección ICV la secuencia inversa A $\beta$ <sub>35-25</sub> del péptido beta amiloide)	EPOCIM intraperitoneal	500 µg/kg una dosis diaria durante 4 días	6
III	Control (Inyección ICV la secuencia inversa A $\beta$ <sub>35-25</sub> del péptido beta amiloide)	Vehículo intranasal	125 µg/kg tres veces al día durante 4 días	6
IV	Control (Inyección ICV la secuencia inversa A $\beta$ <sub>35-25</sub> del péptido beta amiloide)	Neuro-EPO intranasal	125 µg/kg tres veces al día durante 4 días	6
V	Lesionado (Inyección ICV del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> )	Neuro-EPO intranasal	125 µg/kg tres veces al día durante 4 días	6
VI	Lesionado (Inyección ICV del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> )	EPOCIM intraperitoneal	500 µg/kg una dosis diaria durante 4 días	6
VII	Lesionado (Inyección ICV del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> )	Solución salina intraperitoneal	500 µg/kg una dosis diaria	6

			durante 4 días	
VIII	Lesionado (Inyección ICV del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> )	Vehículo intranasal	125 $\mu$ g/kg tres veces al día durante 4 días	6
IX	Control sano	-	-	6

#### Cuantificación de reticulocitos

Para la determinación de reticulocitos se tomaron muestras de sangre en viales que contenían una proporción de 1:1 con azul brillante cresil, posteriormente se realizó un frotis y se observó al microscopio con lente de 100x, según la técnica descrita por el procedimiento operacional correspondiente y sus resultados se expresaron en por ciento.

#### Procesamiento de los cerebros para el estudio histológico:

Una vez finalizados los tratamientos los animales se anestesiaron por vía peritoneal con una mezcla de ketamina-atropina-diazepam (47 mg/Kg; 0.02 mg/Kg; 5 mg/Kg), respectivamente y se perfundieron por vía transcardíaca con 20 ml de solución fisiológica, seguida por 25 ml de solución neutra de formaldehído al 10%. Los cerebros fueron extraídos y mantenidos en la solución fijadora durante 1 semana.

Posteriormente se tomaron dos secciones coronales de 2 mm cada una: a nivel del núcleo caudado-putamen (aproximadamente a +0.1 de Bregma) y otra a nivel del hipocampo dorsal (aproximadamente 1.6 mm de Bregma). Las secciones de tejidos fueron incluidas en parafina, se hicieron cortes de 5  $\mu$ m de grosor y se colorearon con la técnica de hematoxilina – eosina para su observación al microscopio óptico. A continuación se realizó un estudio cualitativo de las muestras histológicas.

Estudio cualitativo: El estudio de las láminas se realizó a ciegas, teniendo en cuenta estructuras como corteza parietal y temporal e hipocampo; así como una valoración general de todo el corte. Se describieron además las lesiones teniendo en cuenta los criterios sobre morfología de las neuronas, perdida de neuronas, espongiosis y reactividad glial. Se tomaron los criterios precisos de daño volumétrico global de las lesiones.

Se tomaron fotomicrografías con una cámara de video CCD marca CANNON acoplada a un microscopio óptico modelo Biostar de la firma OPTECH, conectado a

una computadora. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 4Xy 40 X.

Estudio cuantitativo: Sin conocimiento previo de la identificación de las láminas, se contaron las neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo dorsal de ambos hemisferios. Se consideraron sanas aquellas neuronas con núcleo redondeado, cromatina laxa, de tamaño relativamente grande y no eosinofílicas. Se consideraron neuronas dañadas aquellas que presentaron cariolisis, carriorrexis, eosinofilia, picnosis y/o encogimiento del cuerpo neuronal. En todos los casos se analizaron 2 campos consecutivos de 314  $\mu\text{m}$  de longitud por cada hemisferio. Para la morfometría se utilizó el programa ImageJ 1.34s.

Las densidades lineales de neuronas sanas se compararon entre hemisferios y entre grupos (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney).

#### Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Microsoft STATISTICA versión 6.0. En todos se aceptó un nivel de significación de 0.05.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Sobrevivencia

Se evaluó la sobrevivencia del modelo de forma diaria, permaneciendo todos los animales con vida hasta finalizar el experimento.

#### Conteo de reticulocitos

Al realizar el análisis comparativo del conteo de reticulocitos en los grupos lesionados con administración de Neuro-EPO por vía intranasal y EPOCIM por vía intraperitoneal se encontró una mayor formación de reticulocitos en el grupo donde se utilizó la vía intraperitoneal (Figura 1). Estos resultados demuestran, tal como se ha descrito por otros autores, que la administración de EPOCIM por vía intraperitoneal provoca un aumento de la eritropoyesis. Esta molécula al igual que la EPO endógena actúa en la médula ósea sobre receptores que se encuentran fundamentalmente en los progenitores eritroides produciendo la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides <sup>13, 14</sup>. Como consecuencia de esta acción se produce un aumento de reticulocitos y consecuentemente de la masa eritrocítica. En la actualidad diversos estudios preclínicos y clínicos han utilizado la eritropoyetina recombinante humana (rHu-EPO) como neuroprotector y han empleado para su administración las vías intracerebroventricular, intraperitoneal e intravenosa <sup>15</sup>, mediante las cuales la molécula llega de forma inmediata en el

torrente sanguíneo constituyendo un riesgo potencial de estimulación de la eritropoyesis, la cual incrementa la cantidad de células y como consecuencia la viscosidad de la sangre <sup>16</sup>. La búsqueda de derivados de rHu-EPO sin actividad eritropoyética *in vivo*, pero que conserven sus propiedades neuroprotectoras es actualmente un reto para los investigadores en este campo <sup>17, 18</sup>.

La baja sialilación de la rHu-EPO empleada (Neuro-EPO), disminuye el tiempo de vida media en el plasma y al mismo tiempo evita su actividad eritropoyética, para la cual se requiere una estimulación sostenida en el tiempo. En cambio la función de neuroprotección ocurre mediante un programa de expresión de genes, el cual solo requiere 5 minutos de exposición. De esta manera, la Neuro-EPO, con un tiempo de vida media reducido actuará preferiblemente en el daño tisular, más que en la médula ósea <sup>18, 19</sup>. Esta molécula de Neuro-EPO intranasal muy parecida a la EPO sintetizada en el cerebro no tiene que pasar por el hígado donde sería degradada antes de llegar al SNC debido a que su contenido en ácido siálico es bajo (valores por debajo 10 moléculas de ácidos siálicos/mol de proteínas) y es rápidamente destruida por las enzimas proteasas.

De acuerdo con varios autores, la administración de moléculas protectoras como la Neuro-EPO es una alternativa terapéutica potencial para contrarrestar los daños isquémicos agudos <sup>3, 4</sup>. Se ha demostrado que esta molécula tiene además efecto neuroprotector *in vitro* e *in vivo* demostrando actividad antiexcitoxica, antiapoptótica, angiogénica y neurogénica <sup>20, 21</sup>. En el 2002 se comenzó un estudio piloto en humanos que demostró efectos beneficiosos de la aplicación intravenosa de la molécula de rHu-EPO con infarto cerebral agudo <sup>21</sup>.

Actualmente se continúa trabajando por grupos de investigadores en minimizar o anular el efecto eritropoyético de la molécula de rHu-EPO sin dejar que ejerza su efecto citoprotector en diferentes órganos y patologías <sup>17, 18</sup>.

La evaluación del efecto eritropoyético de una variante de rHu-EPO con bajo contenido de ácidos siálicos permitió demostrar que este producto no incrementa el conteo reticulocitario a través de un ensayo validado internacionalmente. Aún existe la necesidad de evaluar su seguridad por la vía intranasal, ya que en la práctica preclínica las moléculas empleadas con este fin han fracasado en los estudios clínicos por razones de seguridad <sup>21</sup>. Se debe demostrar que los pacientes tratados con Neuro-EPO con bajo contenido de ácido siálico no tienen una estimulación de la eritropoyesis, aspecto que estaría en contra del estado clínico de los pacientes <sup>23</sup>.

Estudio histológico de los cerebros

Al comparar el estudio histológico de los cerebros de los ratones lesionados con administración de Neuro-EPO intranasal con los ratones lesionados con administración de Vehículo intranasal, observamos en éstos últimos una disminución de las células en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ambos hemisferios; así como la presencia de muerte neuronal selectiva y aumento del número de microglías. En general las neuronas piramidales del hipocampo se observaron eosinófilas y en proceso de cariorrexis (Figura 2), lo que sugiere el efecto neuroprotector de la Neuro-EPO administrada.

A y D: Control (Inyección ICV la secuencia inversa A $\beta$ <sub>35-25</sub> del péptido beta amiloide) con administración de Neuro-EPO IN.

B y E: Lesionado (Inyección ICV del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub>) con administración del vehículo IN. Flechas indican células pignóticas.

C y F: Lesionado (Inyección ICV del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub>) con administración de Neuro-EPO IN.

Se realizó conteo de las neuronas sanas de la región de CA1 del hipocampo encontrando menor cantidad de neuronas en los animales lesionados tratados con el vehículo por ambas vías con respecto a los animales lesionados tratados con EPOCIM y Neuro-EPO respectivamente con  $p<0.05$ . Nosotros observamos una significativa disminución en las células viables en el área de CA1 del hipocampo en un 20-24%, en el área de neuronal vulnerable a la toxicidad de A $\beta$ <sub>25-35</sub> previamente.

La vía intranasal es una especial y novedosa solución para hacer llegar la Neuro-EPO al cerebro. Como se ha descrito, la región olfatoria tiene atributos anatómicos y fisiológicos únicos que definen vías extracelulares e intracelulares hacia el SNC, que evaden la Barrera hematoencefálica <sup>24, 25</sup>. Actualmente se sabe que varias sustancias llegan al SNC por inhalación, habiéndose reportado el paso de moléculas tróficas y neuroprotectoras por esa vía <sup>26</sup>.

En un estudio similar al nuestro, realizado en Montpellier/Francia, se demostró un significativo efecto protector de la Neuro-EPO por vía intranasal frente a la toxicidad del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> utilizado en un modelo no transgénico de enfermedad de alzheimer, lo que indica que la formulación intranasal de NeuroEPO puede ser una alternativa de tratamiento fácil y segura a utilizar en estos pacientes <sup>27</sup>.

## CONCLUSIONES

La eritropoyetina presenta un efecto neuroprotector en el modelo no transgénico de la enfermedad de Alzheimer inducido por la inyección intracerebroventricular del

péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> lo que indica que la formulación intranasal de Neuro-EPO puede ser una alternativa de tratamiento fácil y segura a utilizar en estos pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

Waldemar G, Dubois B, Emre M, et al. (January 2007). Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *Eur J Neurol* 14 (1): pp. e1–26. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01605.x. PMID 17222085.

Anuario estadístico de salud 2010. Ministerio de salud pública. Dirección nacional de registros médicos y estadísticas de salud. Abril 2011.

García Salman JD. Protección neuronal endógena: un enfoque alternativo. *Revista de Neurología*. 2004; 38:150-155.

Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*. 2003; 26:248-254.

Brettschneider J, Riepe M. Erythropoietin in the cerebrospinal fluid in neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett*. 2006; 404:347-351.

Widl K. Erythropoietin in cerebrospinal fluid: age-related reference values and relevance in neurological disease. *Neurochem Res*. 2007; 32:1163-1168.

Miller WH A. Brain erythropoietin receptor expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007; 66:389-398.

Modabberniaa A, Ashrafib M, Modabberniac MJ. Let's try erythropoietin in Alzheimer's disease *Medical Hypotheses*. 2010; 75:270-271

Chong Z. Erythropoietin requires NF- $\kappa$ B and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res*. 2005; 2:387-399.

Adriana M, García Rodríguez JC. Formulaciones nasales de EPOrh con bajo contenido de ácido siálico para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. Patente Concedida en Cuba Certificado No. 23317. 2009.

Maurice T, Lockhart BP, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered  $\beta$ -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*. 1996; 706:181-93.

Consejo Canadiense de Protección de los animales. Guidelines for Breeding and Care of Laboratory Animals. World Health Organization and Institucional Council for

Laboratory Animals Science (ICLAS). 1998.

Nagai A, Nakagawa E, Choi HB. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001; 60:386-392.

Siren AL, Knerlich F, Poser W. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.* 2001; 101:271-276.

Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke.* 2004; 35:1732-1737.

Fisher M, Rogalewski A, Ringelstein BE. Toward a Multimodal Neuroprotective Treatment of Stroke. *Stroke.* 2006; 37:1129.

Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, Brines M. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep.* 2003; 2:465-470.

Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science.* 2004; 305:239-242.

Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:6741-6746.

De Keyser J, Sulter G, Guiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemic stroke: are we doing the right thing? *Trends in Neuroscience.* 1999; 22:535.

Yu Y-P, Xu Q-Q, Zhang Q, Zhang W-P, Zhang L-H, Wei E-Q. Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters.* 2005; 387:5-10.

Ehrenreich H, Siren AL. Erythropoietin for Treatment of Human Brain Disease: Experience from Proof-of-Concept Trials. In: *Erythropoietin and the Nervous System*, Springer US. 2006.

Hossmann K.A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. Cellular and Molecular Neurobiology. 2006.

Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release*. 2003; 87:187-198.

Hilger PA. Applied anatomy and physiology of the nose. In: Boies Fundamentals of Otolaryngology, edited by Adams GL, Boies LR, Hilger PA. Philadelphia: W. B. Saunders. 1989.

Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, DeFor TA, Frey WH. Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci*. 2001; 187: 91-97.

Tangu Maurice, Muhammad-Hariri Mustapha, María de la C García-Barceló, Yamila Rodriguez Cruz, Julio César García Rodríguez. Intraperitoneal and intranasal formulations of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the oligomeric A $\beta$ 25-35 nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2012. Disponible en: <http://www.abstractsonline.com/submit/SubmitPrinterFriendl...>

#### ANEXOS

##### Fig. 1

Figura 1. Conteo de reticulocitos en los grupos lesionados con administración de Neuro-EPO y EPOCIM.



Fig.2

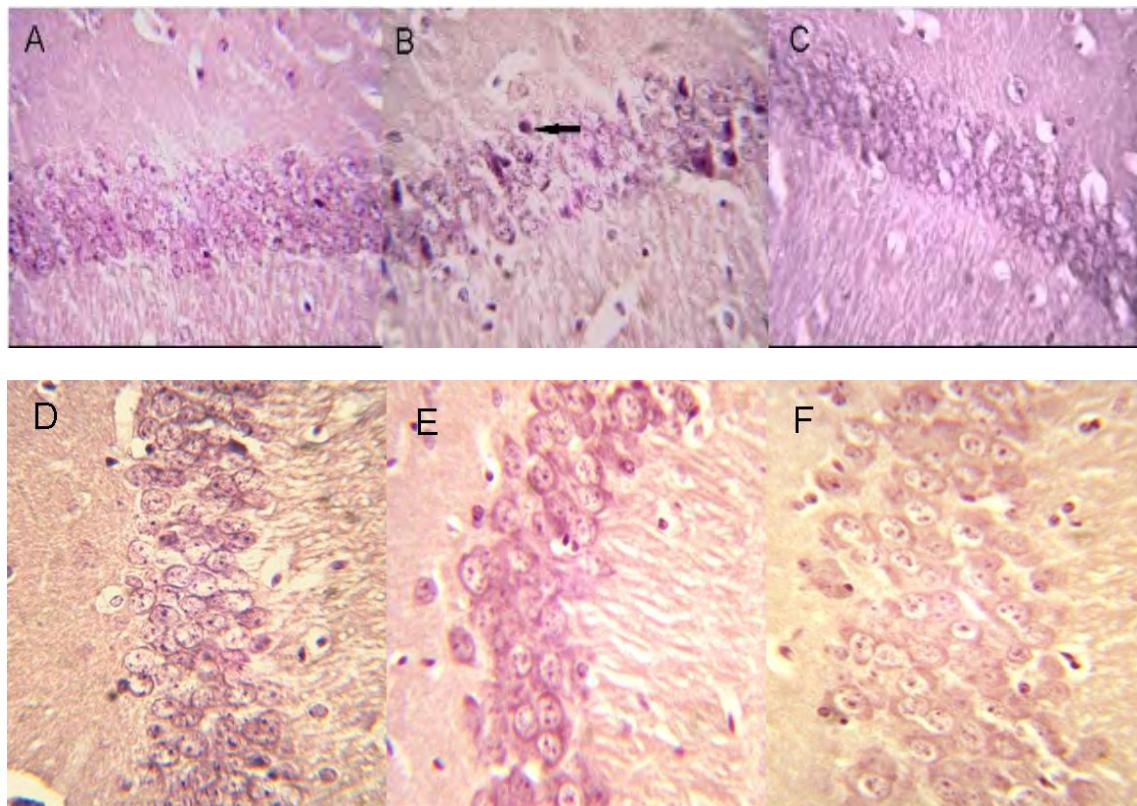


Figura 2. Fotomicrografía óptica de hipocampo de ratones lesionados con la inyección ICV del péptido amiloide  $A\beta_{25-35}$ . Coloración con hematoxilina y eosina. 40X. A,B C. Región CA 1 del Hipocampo. D,E,F. Región CA3 del Hipocampo.

Fig.3 Conteo de Neuronas de CA1

