



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y Molecular

# **EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE UNA ISOFORMA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE DE BAJO NIVEL DE GLICOSILACIÓN.**

CAROLINA ANGÉLICA CASTILLO HERNANDEZ  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2018

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas area Biología Celular  
y Molecular.

Profesor Guía: Dr. Jorge R Toledo A  
Dr. Jorge Fuentealba A  
Depto. de Fisiopatología,  
Depto. De Fisiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en colaboración entre el Departamento de Fisiopatología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Jorge R Toledo Alonso  
Profesor Guía  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dr. Jorge Fuentealba Arcos  
Profesor Guía  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. María de los Angeles García  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Luis Aguayo H  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Jenny Fielder  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de Chile

---

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias  
Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular



*Este trabajo está dedicado a Rosina y Miguel, ejemplos vivos de amor, entrega, perseverancia, temple, coraje, respeto, libertad y fe.*

*A Miguel Angel y Gabriel, por ser compañeros, amigos y hermanos de sangre, ideales y vida.*

*A Matías y Antonia, símbolos de inocencia, amor, ternura y... esperanza de un futuro con un país mejor.*

**AMDG**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis tutores que guiaron el desarrollo de este trabajo: Dr. Jorge Toledo A. (Dpto Fisiopatología, UdeC), Dr. Jorge Fuentealba A. (Dpto Fisiología, UdeC).

En forma especial a la Dra. Manuela García por guiar el desarrollo de mi pasantía en la Universidad Autónoma de Madrid.

A las distintas fuentes de financiamiento que permitieron mi formación y el desarrollo de esta tesis:

- CONICYT: Beca doctorado nacional n° 21130386.
- Proyecto Innova- CORFO n° 13IDL218688 (Dr Jorge Toledo A.).
- Proyecto Fondecyt n° 1130747 (Dr Jorge Fuentealba A.).
- Dirección de Postgrado Universidad de Concepción.
- International Brain Research Organization, IBRO: 9th Canadian IBRO School of Neuroscience, Vancouver BC. 9th Annual Canadian Neuroscience (CAN) Meeting (Mayo, 2015).
- European Molecular Biology Organization, EMBO: Short Term Fellowship ASTF 616-2016, Universidad Autónoma de Madrid, España, Diciembre 2016- Marzo 2017.

A los equipos de trabajo donde se desarrollaron estos experimentos:

- Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Depto de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos, Depto de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- Laboratorio L3, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

## TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	IX
RESUMEN .....	XI
ABSTRACT: .....	XIII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
Eritropoyetina .....	1
Receptor de Eritropoyetina .....	7
Efecto neuroprotector de Epo y EpoR .....	11
Neuroprotección en la lesión isquémica .....	14
Efecto neuroprotector de Epo en neurodegeneración .....	16
Neuroprotección de Epo en la Enfermedad de Alzheimer .....	20
Uso clínico de la hormona Eritropoyetina. ....	25
II. HIPÓTESIS .....	27
III. OBJETIVOS.....	28
IV. METODOLOGÍA.....	29
1 Expresión y purificación de Epo: .....	29
2 Obtención de EpoL a partir de glándula mamaria de cabra: .....	29
3 Actividad hematopoyética: .....	29
4 Cultivo celular: .....	30
4.1 Línea celular pheochromocytoma of the rat adrenal medulla (PC-12): ....	30
4.2 Cultivos primarios de neuronas de corteza de rata: .....	30
5 Ensayos de pretratamientos con Epo y EpoL:.....	31

<b>6 Ensayos de viabilidad celular:</b> .....	<b>32</b>
<b>7 Western blot:</b> .....	<b>32</b>
<b>8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR):</b> .....	<b>34</b>
<b>9 Inmunofluorescencia de cultivos neuronales:</b> .....	<b>35</b>
<b>10 Evaluación de la frecuencia de flujos transientes de Ca<sup>+2</sup> intracelular en cultivos neuronales:</b> .....	<b>35</b>
<b>11 Modelación <i>in silico</i> de las variantes de glicosilación y docking molecular con EpoR y NonHem-EpoR:</b> .....	<b>36</b>
<b>12 Extracción de rebanadas de hipocampo de rata:</b> .....	<b>37</b>
<b>13 Determinación de células vivas en rebanadas de hipocampo:</b> .....	<b>38</b>
<b>14 Medición del estrés oxidativo y muerte celular mediante fluorescencia:</b> .	<b>39</b>
<b>15 Preparación de cultivos organotípicos de hipocampo:</b> .....	<b>40</b>
<b>16 Inmunofluorescencia de cultivos organotípicos de hipocampo:</b> .....	<b>40</b>
<b>17 Análisis estadístico</b> .....	<b>41</b>
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA DE EPOL</b> .....	<b>42</b>
<b>1.1 La variante EpoL no muestra actividad hematopoyética.</b> .....	<b>42</b>
<b>2 CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES NEUROPROTECTORAS DE EPOL FRENTE A DIFERENTES ESTIMULOS QUE INDUCEN ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1 El efecto neuroprotector de EpoL en células tratadas con FCCP depende de la activación de su receptor:</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2 El efecto neuroprotector de EpoL en células PC12 tratadas con peróxido de hidrógeno, depende de la activación de EpoR.</b> .....	<b>48</b>
<b>3 EVALUACIÓN DE LA INTERACCION DE AMBAS VARIANTES GLICOSILADAS CON LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR</b> .....	<b>50</b>

3.1 Epo y EpoL interaccionan con el receptor de la hormona expresado en cerebro:.....	50
<b>4 EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EPO Y EPOL EN ESTRÉS OXIDATIVO USANDO MODELOS <i>EX VIVO</i>.</b> .....	<b>53</b>
4.1 Efecto neuroprotector de Epo y EpoL en modelos ex vivo de hipocampo de rata. ....	53
4.2 Caracterización del efecto neuroprotector de EpoL en rebanadas de hipocampo de rata. ....	55
<b>5 EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EPO Y EPOL EN ESTRÉS MEDIADO POR A<math>\beta</math>.</b> ....	<b>57</b>
5.1 Determinación del efecto neuroprotector de Epo y EpoL en estrés crónico inducido por A $\beta$ <sub>40</sub> . ....	57
5.2 Evaluación de parámetros sinápticos en efecto neuroprotector de Epo y EpoL frente a estrés inducido por A $\beta$ <sub>40</sub> . ....	58
5.2.1 Evaluación del efecto de Epo y EpoL en flujo transiente de Ca <sup>+2</sup> intracelular. ....	59
5.2.2 Evaluación de la participación de EpoR en el efecto preventivo de EpoL en flujo transiente de Ca <sup>+2</sup> intracelular. ....	62
5.2.3 Evaluación del efecto de Epo y EpoL en la presencia sináptica de la proteína SV2. ....	64
<b>6 Evaluación del efecto neuroprotector de Epo y EpoL en el estrés oxidativo inducido por A<math>\beta</math> en cultivos organotípicos de hipocampo.</b> .....	<b>67</b>
6.1 Evaluación de las vías de activación implicadas en el efecto neuroprotector de EpoL en cultivos organotípicos tratados con A $\beta$ . ....	69
6.2 Evaluación del efecto neuroprotector de EpoL en microglia y astrocitos de cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$ . ....	72
6.2.1 <i>Efecto neuroprotector de EpoL en microglia.</i> ....	72
6.2.2 <i>Efecto neuroprotector de EpoL en astrocitos.</i> ....	75
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>77</b>

**VII. CONCLUSIÓN..... 88**

**REFERENCIAS: ..... 89**



## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1</b> Estructura glicoproteica de Eritropoyetina: .....	4
<b>Figura 2</b> Vías de señalización activadas por EpoR: .....	11
<b>Figura 3</b> Vías de señalización activadas por Epo en diferentes condiciones de estrés: .....	24
<b>Figura 4</b> Diferencia en patrón de glicosilación entre Epo y EpoL:.....	26
<b>Figura 5</b> Curso temporal del hematocrito en modelos murinos tratados con dos variantes de eritropoyetina humana recombinante: .....	43
<b>Figura 6</b> El efecto neuroprotector de EpoL en células PC12 tratadas con FCCP, depende de la activación de EpoR: .....	47
<b>Figura 7</b> Evaluación del efecto neuroprotector de variantes de Epo en condiciones de estrés oxidativo agudo: .....	48
<b>Figura 8</b> El efecto neuroprotector de EpoL en células PC-12 tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dependen de la activación de su receptor: .....	49
<b>Figura 9</b> Modelo <i>in silico</i> de la interacción entre las variantes glicosiladas de eritropoyetina y su receptor:.....	52
<b>Tabla 1</b> Caracterización energética de variantes de eritropoyetina.....	53
<b>Figura 10</b> El efecto neuroprotector de Epo y EpoL en rebanadas de hipocampo depende de la activación de EpoR: .....	54
<b>Figura 11</b> El efecto neuroprotector de EpoL en rebanadas de hipocampo está relacionado con la disminución de ROS: .....	56
<b>Figura 12</b> La variante EpoL es neuroprotectora en estrés inducido por tratamientos crónicos con A $\beta$ <sub>40</sub> : .....	58
<b>Figura 13</b> Tratamientos con EpoL previenen la falla sináptica inducida por A $\beta$ : .....	61
<b>Figura 14</b> El efecto preventivo de EpoL en las flujo transiente de Ca <sup>+2</sup> intracelular está relacionado a la activación de EpoR: .....	63
<b>Figura 15</b> Efecto neuroprotector de EpoL en la variación de SV2 inducida por tratamientos crónicos de A $\beta$ : .....	65

<b>Figura 16</b> Efecto neuroprotector de EpoL en la variación de SV2 por tratamientos agudos de A $\beta$ : .....	<b>66</b>
<b>Figura 17</b> El tratamiento con EpoL disminuye el estrés oxidativo en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$ :.....	<b>68</b>
<b>Figura 18</b> El tratamientos con EpoL disminuye la muerte celular en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$ :.....	<b>69</b>
<b>Figura 19</b> El efecto neuroprotector de EpoL en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$ depende de la interacción con EpoR: .....	<b>70</b>
<b>Figura 20</b> El efecto neuroprotector de EpoL en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$ está relacionado con efecto antioxidante:.....	<b>72</b>
<b>Figura 21</b> EpoL previene la activación de la microglia inducida por tratamientos crónicos con A $\beta$ : .....	<b>74</b>
<b>Figura 22</b> EpoL previene los signos de astrogliosis inducidos por tratamientos crónicos con A $\beta$ : .....	<b>76</b>



## **RESUMEN**

La eritropoyetina (Epo) es una hormona glicoproteica que regula principalmente la hematopoyesis, posee un peso molecular de 34 KDa aproximadamente y está conformada por 165 aminoácidos, posee sitios potenciales de N- y O-glicosilaciones en los residuos Asn 24, 38, 83 y Ser 126 respectivamente. Su patrón de glicosilación tetra-antenario y tetra-sialilado se relaciona específicamente con la afinidad por su receptor y directamente con su vida media en circulación. Epo ejerce su efecto mediante la unión a su receptor (EpoR), que pertenece a la superfamilia de receptores de citoquina tipo I, pesa de 66 KDa aproximadamente, y se une a su ligando formando homodímeros en la superficie celular. Esta interacción amplifica una cascada de señalización, principalmente a través de STAT5, PI3K, MAPK, y PKC, lo que da lugar a una regulación positiva de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, como Bcl-xL. Además, la presencia del receptor de Epo en tejidos no eritroides, como en el sistema nervioso central (SNC), sugiere una producción de la hormona en estos tejidos, con una función relevante en la protección ante estrés celular, evitando la apoptosis mediante la activación de su receptor y las vías anteriormente señaladas.

El uso clínico de Epo depende de su producción recombinante, que se desarrolla en sistemas de expresión de cultivos celulares de mamífero como biorreactores, siendo comúnmente utilizadas las células de ovario de hámster chino, lo que tiene como principal desventaja la baja eficiencia y el alto costo productivo.

Alternativamente a este sistema de expresión, el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos ha desarrollado un nuevo método para la producción de eritropoyetina recombinante humana, que consiste en un sistema de transducción directa de la glándula mamaria de cabra con vectores adenovirales que contienen la información génica de eritropoyetina humana. Este sistema permite producir eficientemente la proteína recombinante deseada, generando una variante de Epo con un patrón de glicosilación bi-antenario y carente de ácido siálico, lo que tiene un efecto directo en la disminución de su actividad hematopoyética (EpoL).

Por tanto, el presente proyecto se enfocó en estudiar la interacción EpoL/EpoR en el SNC y sus efectos neuroprotectores, mediados por una variante de Epo recombinante con un patrón de glicosilación bi-antenario y asialilado, frente a modelos de estrés oxidativo crónico. Específicamente, el objetivo del proyecto fue evaluar y caracterizar molecularmente la capacidad neuroprotectora de EpoL, comparándola con Epo nativa. De los resultados podemos señalar que esta variante, tiene un efecto neuroprotector mediado por la activación del EpoR, aumentando la señalización intracelular de vías anti-apoptóticas, disminuyendo el estrés oxidativo local y mejorando los parámetros sinápticos evaluados. Todos estos efectos se obtuvieron a una concentración diez veces menor que con Epo nativa y sin alterar el hematocrito, lo que nos lleva a sugerir el potencial uso de la EpoL como un biofármaco para el estudio y tratamiento de enfermedades relacionadas al SNC con un componente inflamatorio y de estrés oxidativo como el infarto cerebrovascular o enfermedades neurodegenerativas.

**ABSTRACT:**

Erythropoietin (Epo) is a glycoprotein hormone that mainly regulates hematopoiesis, has a molecular weight of approximately 34 KDa and is conformed by 165 amino acids, has potential sites of N- and O-glycosylations in residues Asn 24, 38, 83 and Ser 126, respectively. Its pattern of tetra-antennial and tetra-sialylated glycosylation is related specifically to the affinity for its receptor and directly to its half-life in circulation. Epo exerts its effect through binding to its receptor (EpoR), which belongs to the type I cytokine superfamily of receptors, weighs approximately 66 KDa, and binds to its ligand forming homodimers on the cell surface. This interaction amplifies a cascade of signaling, mainly through STAT5, PI3K, MAPK, and PKC, which results in a positive regulation of antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family, such as Bcl-xL. In addition, the presence of the Epo receptor in non-erythroid tissues, as in the central nervous system (CNS), suggests a production of the hormone in these tissues, with a relevant function in the protection against cellular stress, avoiding apoptosis, through activation of its receptor and the aforementioned routes.

The clinical use of Epo depends on its recombinant production, which is mainly developed in mammalian cell expression systems such as bioreactors, being the most used Chinese hamster ovary cells, which has as main disadvantage of low efficiency and high cost productive. Alternatively to this expression system, the Biotechnology and Biopharmaceutical Laboratory, has developed a new method for the production of recombinant human erythropoietin, which consists of a system

of direct transduction of the goat's mammary gland with adenoviral vectors containing the human erythropoietin gene information. This system allows efficiently producing the desired recombinant protein, generating an Epo variant with a bi-antennaric glycosylation pattern and care of sialic acid, which has a direct effect on the decrease of its hematopoietic activity (EpoL).

Therefore, the present project focused on the EpoL / EpoR interaction in the CNS and its neuroprotective effects, mediated by a variant of recombinant Epo with a bi-antennaric and asialylated glycosylation pattern, *versus* models of chronic oxidative stress. Specifically, the objective of the project was to evaluate and molecularly characterize the neuroprotective capacity of EpoL, comparing it with native Epo. The results can be noted that this variant has a neuroprotective effect mediated by the activation of EpoR, increases the intracellular signaling of anti-apoptotic pathways, decreases local oxidative stress and improves the synaptic parameters evaluated. All these effects were obtained at a concentration ten times lower than with native Epo and without altering the hematocrit, which leads us to suggest the potential use of EpoL as a biopharmaceutical for the study and treatment of CNS-related diseases with a component inflammatory and oxidative stress such as stroke or neurodegenerative diseases.

## I. INTRODUCCIÓN

### Eritropoyetina

La Eritropoyetina (Epo) es una hormona glicoprotéica perteneciente a la superfamilia de citoquinas tipo I responsable principalmente de la proliferación, diferenciación y maduración de células eritroides, tanto en estado embrionario, como en estado adulto (Bunn 2013). La Epo está conformada por 165 amino ácidos, que como otras citoquinas hematopoyéticas, se pliegan en una estructura tridimensional globular consistente en cuatro hélices anfipáticas conectadas por bucles y estabilizadas por dos puentes disulfuro internos entre las cisteínas 7-161 y 29-33, los que son importantes en el mantenimiento de la actividad biológica de la molécula y que constituyen el 60% de su masa molecular (~34kD) (Batmunkh *et al* 2006, Bunn 2013). Además, ésta hormona contiene 4 cadenas de oligosacáridos que conforman el 40% restante de su peso molecular, de las cuales 3 son N-glicosilaciones, localizadas en las posiciones Asn-24, Asn-38 y Asn-83 y una cuarta cadena que es O-glicosilada en el residuo Ser-126 (Sinclair 2013). La distribución de las glicosilaciones genera heterogeneidad en la proteína madura, mientras que la ausencia de glicosilaciones reduce la estabilidad de las especies intermedias y provoca cambios en la cinética de plegamiento de Epo (Jiang *et al* 2014).

La glicosilación de proteínas es la modificación post-traducciona l más común, y consiste en la adición de una o más cadenas de hidratos de carbono a las proteínas de membrana o proteínas secretadas, que son sintetizadas en el retículo

endoplásmico (RE) (Lodish *et al*, 2005). En eucariontes existen dos tipos fundamentales de glicosilación, la O- y la N-glicosilación. La O-glicosilación consiste en la unión sucesiva de moléculas de monosacáridos a la proteína, mediante un enlace covalente entre la N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina (GalNAc) y el grupo hidroxilo de la L-serina (Ser) o la L-treonina (Thr). Mientras que la N-glicosilación consiste en la adición de glicanos mediada por una unión covalente entre la N-acetil- $\alpha$ -D- glucosamina (GlcNAc) y el nitrógeno del grupo amida en la L-asparagina (Asn)(Hossler *et al* 2009). Las N-glicosilaciones son las más comunes, complejas y ramificadas de las glicosilaciones, y están relacionadas con el plegamiento correcto de proteínas, impidiendo su degradación y agregación, influyendo así, en su estabilidad termodinámica (Banks 2011).

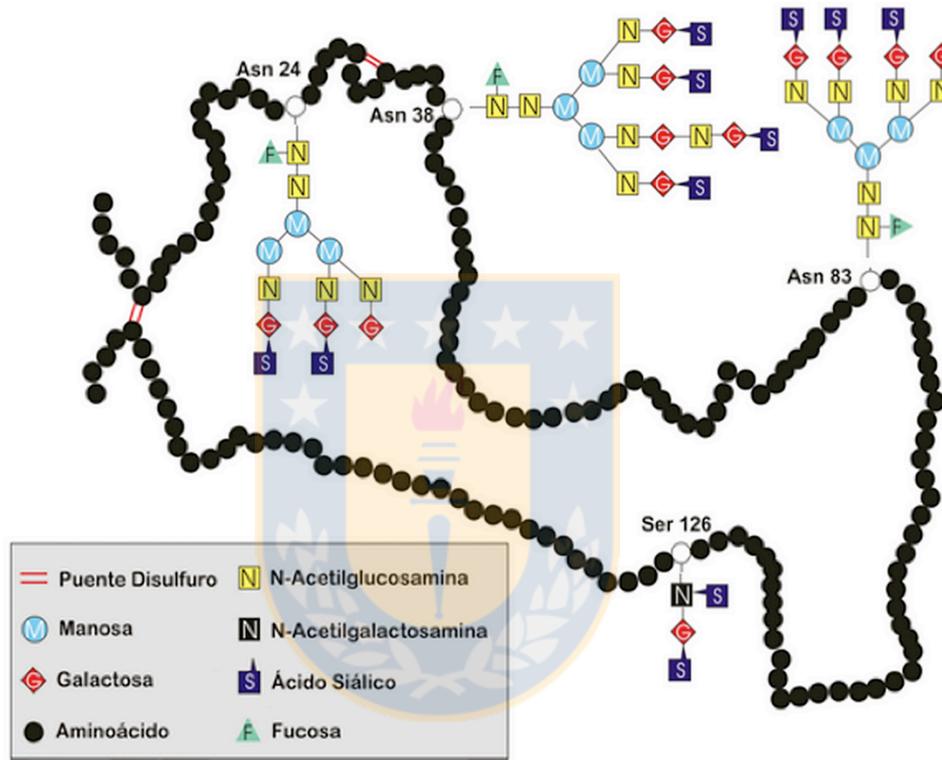
La biosíntesis de todos los oligosacáridos N-enlazados comienza en el RE rugoso con la unión de un precursor oligosacárido preformado que contiene 14 residuos (Banks 2011). La estructura de este precursor es altamente conservada: un oligosacárido ramificado, que contiene tres moléculas de glucosa (Glc), nueve de manosa (Man) y dos de N-acetilglucosamina (GlcNAc), abreviándose como: Glc,Man<sub>9</sub> (GlcNAc)<sub>2</sub> (Hossler *et al* 2009). Esta estructura ramificada puede ser modificada en el RE y el complejo de Golgi, pero en las proteínas que son secretadas y las de membrana se conservan 5 de los 14 residuos de oligosacáridos, a los que podemos identificar como: “precursores”, que se unen por un residuo pirofosforilo al dolicol, actuando como un “portador” para la formación del oligosacárido final. El precursor de 14 residuos es transferido del

dolicol a un residuo de asparagina del polipéptido naciente, donde sólo los residuos de asparagina en las secuencias tri-peptídicas Asn-X-Ser y Asn-X-Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina) son sustratos para la oligosacaryltransferasa, enzima que cataliza esta reacción. Sin embargo, es importante destacar que no todas las secuencias Asn-X-Ser se glicosilan, sino que son sitios potenciales de glicosilación (Hossler *et al* 2009, Jiang *et al* 2014).

En la Epo las glicosilaciones corresponden mayoritariamente a tetra-antenas con terminaciones en ácido  $\alpha(2-6)$ N-acetil-Neuroamínico (Neu5Ac  $\alpha 2-6$ ) y no se observa N-acetil glucosamina (GlcNAc) unida a la manosa del núcleo. Además, se encuentran estructuras bi y tri antenarias pero en menor proporción (Banks 2011). Las terminaciones en Neu5Ac tienen una directa relación con el tiempo de vida media de la molécula, ya que también la protegen de la degradación por radicales libres (Ingley 2012, Parra & Rodriguez 2012). La carga negativa que aporta el ácido siálico es responsable de las propiedades ácidas de la molécula, que presenta un punto isoeléctrico entre 3.31 y 4.11 (Morimoto *et al* 1996). Asimismo, las cadenas de oligosacáridos unidas a Epo aumentan su tamaño molecular y con esto impiden que sea filtrada a través de los riñones y por otro lado, la presencia de ácido neuroamínico terminal impide que se expongan residuos de galactosa, que debieran ser reconocidos por sus receptores en el hígado, aumentando el tiempo de vida media de la hormona glicoprotéica en sangre (Fukuda *et al* 1989)

Figura 1. Las glicosilaciones también son necesarias para el transporte plasmático de Epo y para su paso desde la sangre hacia la médula ósea a través de las

células endoteliales, ya que la composición y estructura de estos carbohidratos determinan la estabilidad conformacional de Epo y las características de unión a su receptor (Jelkmann *et al* 2008, Chateauvieux *et al* 2011).



### Figura 1 Estructura glicoproteica de Eritropoyetina:

Se compone de 165 aminoácidos y 4 cadenas laterales de glicosilaciones que corresponden con tres sitios potenciales de N-glicosilación en Asn-24, -38, y -83, y un sitio de O-glicosilación en Ser-126. Se especifica en el esquema la composición de cada cadena de glicosilación (Extraído y modificado de Machnik, M., *et al.* 2002).

Durante el desarrollo fetal Epo se produce en el hígado, y posterior al nacimiento se sintetiza principalmente en las células peritubulares del riñón (80%) como respuesta a una disminución en la tensión de oxígeno (Bunn 2013). La hipoxia

estimula esta producción, principalmente a través del factor de transcripción “Factor Inducible de Hipoxia” (HIF-1) (Toledo *et al* 2006, Parra & Rodriguez 2012, Heir *et al* 2016), el cual estimula la transcripción génica de Epo al unirse al potenciador (*enhancer*) que flanquea la región 3’ del gen y con esto aumenta la producción y liberación de Epo al plasma. Una vez en circulación se une a su receptor (EpoR), que se expresa mayoritariamente en células eritroides, y promueve la proliferación y maduración de progenitores eritroides, aumentando la cantidad de glóbulos rojos circulantes, lo que finalmente permite mejorar el transporte de oxígeno (Chateauvieux *et al* 2011, Maiese *et al* 2012, Bunn 2013). Los efectos de Epo se producen por la interacción Epo/EpoR, que activa vías de señalización, actuando principalmente sobre el control de la apoptosis de las células progenitoras eritroides, para disminuir su tasa de muerte celular en la médula ósea durante las etapas finales del desarrollo, especialmente en la unidad formadora de colonias eritroides (CFU-E) (Chateauvieux *et al* 2011, Bunn 2013). Así, Epo induce la proliferación y maduración desde normoblastos a reticulocitos, que finalmente eliminarán su núcleo y serán liberados desde la médula ósea hacia circulación sanguínea, donde se produce la diferenciación final a eritrocitos, que tienen una vida media de aproximadamente 120 días en un humano adulto normal (Fisher 2003, Sinclair 2013). La concentración plasmática de Epo en individuos sanos es de 10-20 mUI/mL y su vida media es de 7-8 hrs (Fisher 2003, Toledo *et al* 2006, Chateauvieux *et al* 2011, Bunn 2013).

Además, de la producción de Epo en riñón, se han descrito sitios secundarios de producción como células de la retina y astrocitos, lo que sugiere que Epo tiene una función no sólo en la hematopoyesis, sino también en diferentes tipos de tejidos, participando en la protección de éstos en casos de estrés celular, evitando la apoptosis (Merelli *et al* 2015). Esta producción fuera del tejido eritroide equivale al 15-20% de la producción total de Epo en el organismo y posee algunas diferencias en el patrón de glicosilación con respecto a la hormona producida a nivel renal (Ponce *et al* 2013). Un patrón de glicosilación con ramificaciones biantenarias y menos moléculas de ácido siálico, diferente al de Epo circulante en plasma, está relacionado con una actividad hematopoyética y una vida media reducida, pero una mayor afinidad a su receptor (Jelkmann 2002, Maurice *et al* 2013, Jiang *et al* 2014).

Lo anterior concuerda con el descubrimiento de EpoR en tejidos no eritroides, como en el sistema nervioso central (SNC) (Brines & Cerami 2005, Rabie & Marti 2008, Yu *et al* 2016), y con el efecto neuroprotector observado en experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se hicieron tratamientos con Epo (Wu *et al* 2011, Yu *et al* 2016), que nos permiten sugerir que algunos de los efectos pleiotrópicos de Epo están relacionados con neurogénesis y angiogénesis, participando como factor neurotrófico e inmunomodulador (Gan *et al* 2012, Maiese *et al* 2012, Parra & Rodriguez 2012, Ratilal *et al* 2014). Además, se comprobó que la Epo producida en SNC, también posee efectos neuroprotectores (Gan *et al* 2012, Maurice *et al* 2013, Rodriguez Cruz *et al* 2017).

## Receptor de Eritropoyetina

En estos efectos inducidos por la hormona, es fundamental la participación de EpoR, que es un receptor transmembrana perteneciente a la superfamilia de receptores de citoquina tipo I, pesa 66 KDa, y se encuentra preformado como homodímero inactivo en la superficie celular, en una densidad de aproximadamente 1000/CFU-E, en médula ósea (Bunn 2013).

Con respecto a la interacción de Epo con EpoR, se demostró que existen dos regiones de la hormona que se unen al receptor, primero se une una región de alta afinidad (con una  $K_m$  de 1nM), y posteriormente lo hace la otra, con una afinidad mil veces menor (con  $K_m$  de 1  $\mu$ M) (Cheetham *et al* 1998). La región de Epo que se une con mayor afinidad al receptor se caracteriza por tener varios residuos altamente hidrofóbicos como Phe 138, Phe 142, Tyr 145, Phe 148, Leu 153 y Tyr 156, los que al estar unidos en regiones apolares de Epo, forman un “core hidrofóbico” que interaccionan con un motivo específico del receptor (“WSXWS motif”, de los residuos 209-213, donde X=Glu), el cual además, está directamente relacionado con su expresión en la membrana celular y su activación (Syed *et al* 1998).

La síntesis de EpoR en el RE es ineficiente, y sólo un 10% de la proteína se transporta hacia la membrana celular. En este proceso es muy importante la unión de tirosincinasa *Janus Kinasa-2* (JAK-2) a través de su región N- terminal a la

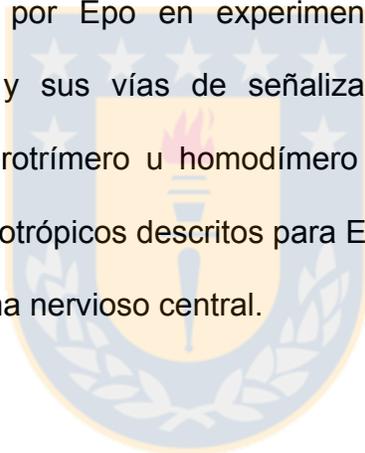
región citoplasmática del receptor, lo que promueve un proceso de plegamiento correcto de EpoR y su expresión en la superficie de la membrana celular, convirtiendo a JAK-2 en una proteína fundamental para la correcta señalización de EpoR (Javadi *et al* 2012). La unión de Epo a uno de los monómeros de su receptor, expresado en la membrana celular (homodímero inactivo), induce un cambio conformacional que los acerca, formando un homodímero que activa a la JAK-2 (Lodish *et al* 2005). Se produce la transfosforilación de éstas proteínas en los residuos de tirosina ubicados en la región citoplasmática del receptor de Epo (Ma *et al* 2014). Esto servirá como sitio de unión para otras proteínas implicadas en la amplificación de la cascada de señalización de EpoR, por ejemplo, estimula la unión del dominio “Dominio 2 de homología a Src” (SH2) del factor de transcripción “signal transducer and activator of transcription-5” (STAT-5), activándolo (Lodish *et al*, 2005). La vía de señalización JAK2/STAT-5 es la principal vía estimulada posterior a la interacción de la hormona con su receptor y tiene una función relevante a nivel fisiológico, ya que regula una serie de procesos involucrados con crecimiento y diferenciación celular y además, modula la translocación nuclear de STAT-5 fosforilado, que regula la expresión de genes anti-apoptóticos miembros de la familia Bcl-2 (como Bcl-XL) y disminuye los niveles de caspasa-3 (Brines & Cerami 2005, Ma *et al* 2014).

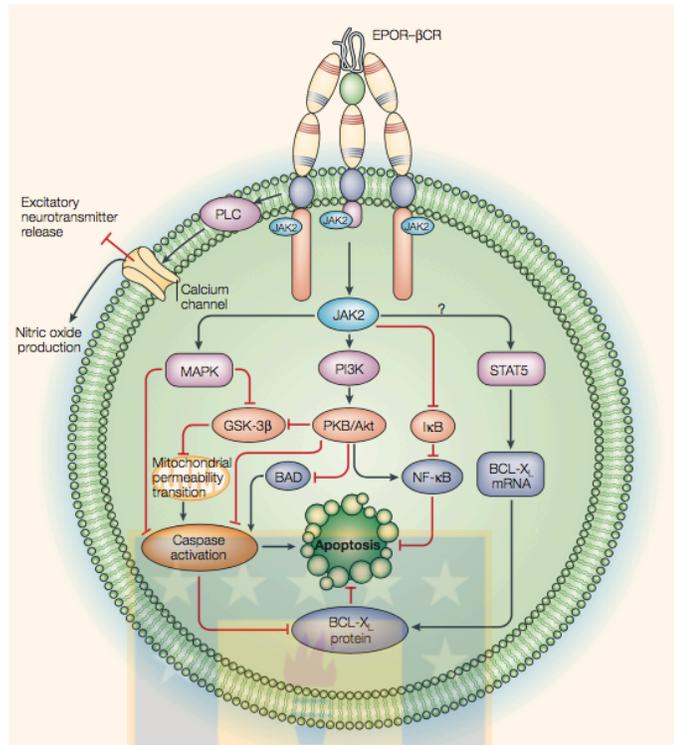
La unión de Epo a su receptor, también promueve la activación de la vía *phosphoinositol 3'-kinase* (PI3K), *Ras-mitogen-activated protein kinase* (MAPK), y *nuclear factor- $\kappa$ B system* (NF- $\kappa$ B) (Adlung *et al* 2017). PI3K/AKT, es una vía de

señalización esencial para mantener la proliferación celular que también se activa al unirse a uno o dos de los motivos SH2 del receptor y se relaciona con la maduración de los precursores eritroides, promoviendo la división celular y proliferación (Chan *et al* 2017). Además, influye directamente en crecimiento, división celular, metabolismo y apoptosis, principalmente a través de la vía de activación del *mammalian target of Rapamicin* (mTOR) (Sun *et al* 2013, Adlung *et al* 2017). Al activar la vía de señalización mTOR, PI3K influye directamente en el bloqueo de la apoptosis mediante la activación del complejo mTORC1 e influye en el progreso del ciclo celular. PI3K también activa al complejo mTORC2, que finalmente fosforila a AKT, activándolo, mediante la regulación de proteínas que controlan la apoptosis como: *Bcl-2-associated death promoter* (BAD), *Bcl-2-interacting mediator of cell death* (BIM) y *Bcl-2-associated X-protein* (BAX), PI3K también degrada p53 y activa al *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B), preservando la integridad en la membrana mitocondrial al impedir la liberación de citocromo C (Sun *et al* 2013, Terraneo *et al* 2017, Terraneo & Samaja 2017). La activación de PI3K también induce la señalización de MAPK, una quinasa del tipo serina/treonina que fosforila proteínas relacionadas con el ciclo y la diferenciación celular, garantizando su translocación al núcleo, donde se activan genes de respuesta temprana y factores de transcripción como *c-fos* o *c-jun*.

Los efectos pleiotrópicos de Epo están relacionados con la expresión de EpoR en tejido no eritroide, el que es estructuralmente diferente al del tejido

hematopoyético, y se caracteriza principalmente por ser heterodimérico o heterotrimérico (NonHem-EpoR) (Masuda *et al* 1993, Brines *et al* 2004, Brines & Cerami 2005). Este heterotrímero está conformado por una o dos subunidades  $\beta$ , idénticas a la región  $\beta$  de receptores de citoquinas como el receptor de citoquina IL3 o el receptor de GMSCF (subunidad también llamada CD131), y una subunidad idéntica a la clásica de EpoR (Brines & Cerami 2005). Es importante destacar que se ha comprobado la participación de estas cadenas  $\beta$  en los efectos intracelulares mediados por Epo en experimentos *in vitro*, por lo tanto, la activación del receptor y sus vías de señalización es independiente de su conformación como heterotrímero u homodímero (Brines *et al.* 2004) Figura 2. Dentro de los efectos pleiotrópicos descritos para Epo, nos centraremos en discutir los relacionados al sistema nervioso central.





**Figura 2 Vías de señalización activadas por EpoR:**

Esquema que señala las principales vías de señalización activadas luego de la unión de Epo a su receptor, ya sea en la forma de EpoR hematopoyético (homodimérico) o en su forma heterotrímica, expresada en tejido no hematopoyético. Extraído de *Brines & Cerami, 2005*.

### **Efecto neuroprotector de Epo y EpoR**

Durante décadas Epo se ha utilizado como tratamiento clínico para pacientes con anemia o fallas renales crónicas (Bunn 2013). Además de este uso clásico de la hormona, se ha descrito que en tratamientos *in vivo* en animales y humanos, hubo una notoria mejora en las habilidades cognitivas, evaluadas mediante la prueba de water maze o evaluaciones clínicas (mediante el índice de Barthel) en casos de pacientes (Ehrenreich *et al* 2004, Ehrenreich *et al* 2007). En estos pacientes también se observó una corrección en el hematocrito, reforzando la idea que la

administración exógena de Epo tiene efectos positivos y directos en el SNC (Ehrenreich *et al* 2004, Ehrenreich *et al* 2007, Ott *et al* 2015, Maiese 2016a).

La producción de Epo en el cerebro de mamíferos corresponde a una variante de la hormona que presenta un tamaño menor y mayor actividad biológica *in vitro* que la circulante en plasma, lo que principalmente se debe a diferencias en el patrón de glicosilación, además se ha observado que tiene un rol fundamentalmente neuroprotector (Masuda *et al* 1993, Masuda *et al* 1999a, Masuda *et al* 1999b, Parra & Rodriguez 2012). En estos efectos *in vitro* se ha descrito que la activación de EpoR es fundamental, ya que en células PC12 estresadas con un péptido directamente relacionado con la enfermedad de Alzheimer denominado A $\beta$ <sub>25-35</sub>, que son pretratadas con Epo durante 1 h hay un efecto neuroprotector que se pierde cuando se utiliza un bloqueador de STAT-5, mencionado previamente como una de las principales vías de señalización que activa el EpoR (Ma *et al* 2009, Ma *et al* 2014). Del mismo modo, se ha observado neuroprotección *in vivo* en ratas pretratadas con Epo incluso 10 minutos antes de inducir isquemia con el método de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), donde la neuroprotección se evaluó midiendo el volumen de tejido dañado, observándose una disminución del tejido necrosado y en el porcentaje de edema en ratas pretratadas con Epo. Además, se observó un aumento en la expresión de EpoR en la región isquémica (Yu *et al* 2005, Castaneda-Arellano *et al* 2014, Ratilal *et al* 2014). Efectos similares de neuroprotección en pretratamientos con Epo fueron reportados en otros modelos animales como *Drosophila melanogaster*, las que fueron estresadas en

condiciones de hipoxia, donde se demostró que este efecto es dependiente de la activación de EpoR (Miljus *et al* 2014). Estos datos son consistentes con la idea de una producción de Epo en el sistema nervioso central, independiente a la de Epo circulante en plasma, ya que se ha reportado que los astrocitos pueden sintetizar Epo y EpoR, pero las neuronas sólo expresan el receptor. Esto sugiere que se activarán mecanismos de neuroprotección estimulados por la producción de la hormona en respuesta a estrés, inflamación o hipoxia (Masuda *et al* 1999b, Rabie & Marti 2008, Maurice *et al* 2013). Como se mencionó anteriormente, en ciertas regiones del cerebro humano como el hipocampo, amígdala y corteza prefrontal se ha observado la expresión de EpoR y Epo de forma inducible por hipoxia, principalmente a través de HIF-1 $\alpha$  (Ponce *et al* 2013, Nekoui & Blaise 2017). Sin embargo, también se ha demostrado que éste factor de transcripción se induce con el aumento de mediadores pro-inflamatorios como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  o Lipopolisacárido (LPS), los que además, disminuyen al aumentar la producción local de Epo, reflejando un mecanismo regulatorio intrínseco y sugiriendo que la expresión de Epo/EpoR también tiene a un rol anti-inflamatorio compensatorio en respuesta a estrés inflamatorio (Rabie & Marti 2008, Merelli *et al* 2015, Pang *et al* 2016).

Muchas enfermedades relacionadas con el SNC tienen un componente inflamatorio importante, como por ejemplo: lesión isquémica por infarto cerebrovascular, esquizofrenia, o enfermedades neurodegenerativas como

esclerosis múltiple, Parkinson y Alzheimer (AD) (Chong *et al* 2013, Erbas *et al* 2015, Pasqualetti *et al* 2015).

### **Neuroprotección en la lesión isquémica**

Entre las enfermedades asociadas al SNC con un componente inflamatorio relevante, encontramos la lesión inducida por los eventos de isquemia cerebral. La lesión isquémica está caracterizada por una disminución del ATP, asociado a una disrupción en la bomba ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  lo que conlleva a un desequilibrio iónico severo (Grupke *et al* 2015, Siddiqui *et al* 2015). En el cerebro, estos eventos están acompañados con un aumento en la excito-toxicidad mediada por la liberación de glutamato, acidosis, disfunción de canales de calcio, liberación de citoquinas pro-inflamatorias, que finalmente llevan a la activación de los “receptores de muerte” y a apoptosis. Así, la activación de caspasas, especialmente caspasa 3 que es sobre-expresada en procesos de apoptosis neuronal, puede ser una de las principales causas de muerte en la lesión inducida por isquemia (Gu *et al* 2014, Lu *et al* 2014).

Se ha reportado la expresión de Epo y EpoR en el SNC, pero además, en el caso de lesiones, por ejemplo isquémicas, se observa una sobreexpresión de EpoR, especialmente en células endoteliales, astrocitos e incluso neuronas (Sargin *et al* 2011, Zhou & Yu 2013, Ott *et al* 2015). De hecho, Epo tiene efecto neuroprotector en eventos de hipoxia mediante la activación de EpoR que además está sobre-expresado (Parra & Rodriguez 2012).

Epo modula la actividad de diferentes canales a través de la regulación del volumen celular y la neurogenesis en áreas afectadas por la isquemia y reperfusión (Iwai *et al* 2007, Iwai *et al* 2010).

Los efectos neuroprotectores de Epo *in vivo* han sido reportados, usando el modelo de oclusión de la arteria cerebral media, MCAO, donde se ha observado un 35% de reducción del edema en zonas necróticas con respecto a la zona saludable (Zhang *et al* 2014a, Zhang *et al* 2014b). Además, los animales tratados con Epo muestran un incremento en la expresión de EpoR en las zonas isquémicas del cerebro (Yu *et al* 2005, Castaneda-Arellano *et al* 2014, Ratilal *et al* 2014, Yu *et al* 2016). En modelos de hipoxia desarrollados en cardiomiocitos, el tratamiento con Epo induce una sobreexpresión dosis-dependiente del mRNA de PGC1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor y co-activator 1  $\alpha$* ), uno de los principales reguladores de la biogénesis mitocondrial, y además incrementa el número de mitocondrias. Estos hallazgos sugieren un efecto positivo de la hormona en la biogénesis mitocondrial y en los mecanismos anti-apoptóticos (Qin *et al* 2014). La Epo ha sido asociada con una inhibición de la permeabilidad del poro mitocondrial, una reducción del edema cerebral y de caspasa-3 en ratas con accidente cerebral traumático, sugiriendo una relación directa entre neuroprotección y la salud mitocondrial (Millet *et al* 2016). En paralelo, pretratamientos de Epo han demostrado prevenir la disminución del potencial de membrana mitocondrial inducido por lesiones isquémicas (Wang *et al* 2004, Wang *et al* 2014, Wang *et al* 2015). Se han observado efectos neuroprotectores en

pacientes con accidente isquémico agudo que han usado tratamiento con Epo recombinante humana a las 6, 24 y 48 hrs posteriores al infarto cerebral (evaluado usando el indicador Barthel) y también se ha reportado una mejora cognitiva en el uso clínico de pacientes con esquizofrenia (Ehrenreich *et al* 2002, Ehrenreich *et al* 2004, Ehrenreich *et al* 2007). Sin embargo, se reportaron efectos negativos del tratamiento con Epo cuando se usó en los mismos tiempos antes mencionados, pero en conjunto con compuestos trombolíticos como el factor activador recombinante de plaquetas (rtPA), sugiriendo que su uso clínico combinado no es recomendable (Ehrenreich *et al* 2002, Ehrenreich *et al* 2009).

### **Efecto neuroprotector de Epo en neurodegeneración**

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de patologías que se caracterizan por la pérdida paulatina y progresiva de las funciones neurológicas (Chong *et al* 2013, Kumar *et al* 2015). Dentro de éstas se destaca, por su prevalencia, la enfermedad de Alzheimer, que se describe como una disminución progresiva del parénquima cerebral, las funciones cognitivas y la pérdida de la memoria, conduciendo finalmente a la demencia (Chong *et al*. 2013).

De acuerdo a la OMS, cerca de 25 millones de personas sufren esta enfermedad en la actualidad, y ésta no tiene aún un tratamiento que permita detener su progresión. La segunda patología neurodegenerativa más común es la enfermedad de Parkinson, que además es el desorden motor más prevalente (Erbas *et al* 2015). Ésta se caracteriza clínicamente por rigidez muscular, bradiquinesia (lentitud en los movimientos), temblor en estado de reposo, y

acinesia por lo tanto, el tratamiento para la Enfermedad de Parkinson en la actualidad, está dirigido a disminuir de los signos clínicos que el paciente presenta, esta terapia consiste en la administración del fármaco Levodopa, precursor de la dopamina. Sin embargo, el principal inconveniente de su uso prolongado es la generación de complicaciones motoras, dentro de las que se encuentra el fenómeno de “*wearing off*”, que corresponde a una reaparición o empeoramiento de los síntomas parkinsonianos (Park *et al* 2009, Park *et al* 2011).

Considerando que no existe un tratamiento que permita detener el progreso de estas enfermedades, resulta relevante buscar nuevas terapias que permitan disminuir el avance de estas patologías. Ante esta problemática, es importante destacar que la Epo se ha caracterizado como una molécula que puede detener el daño neuronal provocado por agentes relacionados a enfermedades con componente inflamatorio, como las neurodegenerativas.

En los casos clínicos donde se ha utilizado Epo como agente neuroprotector se observó una mejora en la función cognitiva y hematopoyética de los pacientes con enfermedades relacionadas al SNC como esquizofrenia o accidente cerebrovascular, en los cuales también hubo un incremento en la expresión de EpoR en el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Rabie & Marti 2008).

Por ejemplo, se ha observado que la acumulación extracelular de A $\beta$ , péptido relacionado directamente con la Enfermedad de Alzheimer, induce apoptosis celular, lo que se evidencia por la condensación de cromatina, la fragmentación del ADN, y la exposición de fosfatidilserina en la porción extracitoplasmática de la

membrana celular (Esmaeili Tazangi *et al* 2015, Kumar *et al* 2015). Eventos de muerte celular evaluados usando *Trypan blue*, fueron prevenidos hasta en un 30% en un modelo de neuronas de hipocampo de rata expuestas a toxicidad inducida por A $\beta$ <sub>42</sub> (5  $\mu$ M, durante 24 hrs), que recibieron pretratamientos con Epo (10 ng/ml) durante 1 h *versus* neuronas no pretratadas, mediante la activación de NF- $\kappa$ B (Chong *et al* 2005). Estos datos *in vitro*, se correlacionan con datos *in vivo*, donde observaron que en ratas inyectadas intracerebralmente con A $\beta$ <sub>42</sub> (5 $\mu$ g/mL) y tratadas una vez al día por dos semanas con una dosis intraperitoneal (i.p.) de 1000 UI/kg de Epo, hubo una mejora en los parámetros de pérdida de memoria, evaluados mediante *wáter maze*, además de la prevención de signos apoptóticos y de falla mitocondrial en los lisados cerebrales (Li *et al* 2015). También coincide con lo reportado para tratamientos de menor dosis de Epo (5000UI/kg i.p.) en aplicación única, que fue usado en un modelo animal de AD inducido por inyección intraventricular de A $\beta$ <sub>25-35</sub> (7.5 $\mu$ g/ml), en donde también se determinó una mejora en los parámetros de memoria y aprendizaje mediante la prueba de evitación pasiva, además de una disminución en la liberación de glutamato inducido por A $\beta$  (Esmaeili Tazangi *et al* 2015, Li *et al* 2015). También se demostró que el tratamiento con Epo en las neuronas colaterales de Schaffer de la región CA1 del hipocampo, previene la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP), inducido por A $\beta$ <sub>25-35</sub> (Esmaeili Tazangi *et al* 2015).

Estos hallazgos también se han relacionado con una proliferación neuronal impulsada por tratamientos con Epo (5000 UI/kg, i.p.) en la región del giro dentado

del hipocampo de un modelo de AD inducido por inyección intracerebroventricular con estreptozotocina (Arabpoor et al. 2012). Además, estos datos concuerdan con lo observado en pacientes con trastorno cognitivo medio y AD, en los que se demostró que la expresión de EpoR en lisados cerebrales es notoriamente mayor en pacientes con Enfermedad de Alzheimer, en comparación a pacientes con trastorno cognitivo medio o pacientes sanos; sugiriendo que en condiciones de estrés crónico hay una respuesta anti-apoptótica y neuroprotectora inducida por Epo (Assaraf et al 2007).

También se ha descrito un efecto neuroprotector en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, donde de un modo similar a lo ocurrido en la Enfermedad de Alzheimer, varias pruebas *in vitro* determinaron que pretratamientos con Epo previenen la muerte celular (Park et al 2009). Además, este efecto es dependiente de la activación del receptor de eritropoyetina, ya que se pierde la neuroprotección al utilizar un bloqueador de PI3K, una de las principales vías activadas por EpoR mencionadas previamente (Park et al 2009, Won et al 2009, Park et al 2011). Resulta interesante que este efecto se replica en enfermedades neurodegenerativas menos prevalentes como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), patología que se caracteriza por la muerte selectiva de las motoneuronas superiores (corteza motora y tronco cerebral) e inferiores (médula espinal) que produce parálisis progresiva y atrofia (Naganska et al 2010). La ELA es una patología de aparición esporádica, sin embargo, también se ha reportado que en un 10% de los casos hay un carácter familiar, entre ellos,

el 20% de los casos se ha asociado con mutaciones en la proteína superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Naganska *et al* 2010, Noh *et al* 2014). En ratones transgénicos para ELA (SOD1<sup>G93A</sup>), también se observó que el tratamiento con Epo (5000 UI/kg i.p.) durante 120 días previene la muerte de motoneuronas del modelo animal en comparación con el grupo no tratado con Epo. Además, previene la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y promueve la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias en este mismo modelo animal (Noh *et al* 2014).

En conjunto, estos hallazgos sugieren una potencial función neuroprotectora de la eritropoyetina en el tratamiento para este grupo de enfermedades asociadas al SNC, donde se ha observado un importante componente inflamatorio (Chong *et al.* 2013; Noh *et al.* 2014).

### **Neuroprotección de Epo en la Enfermedad de Alzheimer**

Se ha postulado que el péptido beta amiloide (A $\beta$ ) en la Enfermedad de Alzheimer es responsable de la pérdida de la homeostasis iónica neuronal, lo que se considera una característica clave de la enfermedad, ya que forma un poro que permite la entrada masiva de cationes, especialmente Ca<sup>2+</sup>, provocando una serie de eventos intracelulares como la inducción de la apoptosis (Kumar *et al* 2015).

En modelos celulares pre-tratados con el péptido beta amiloide, se han observado moléculas que previenen la activación de la apoptosis, entre estas, la Epo, activa su receptor e inicia la transcripción de los genes Bcl-2 que bloquean la apoptosis y previenen la muerte celular (Sargin *et al* 2010, Sargin *et al* 2011, Jo *et al* 2016). Se ha propuesto que la neuroprotección inducida por Epo está mediada por la

activación del EpoR, seguido de un incremento en el factor nuclear *kappa-light-chain-enhancer activity of activated B cells* (NFκB), causando una inhibición de las proteínas de la cascada apoptótica y un bloqueo en la activación de caspasas, inducidas después de la acumulación de TNFα, un evento observado en pacientes con AD (Stefani *et al* 2006). El bloqueo de la actividad de las caspasas está directamente relacionado con otras vías de señalización activadas por el EpoR, por ejemplo, con la activación de Bcl-xL, que causa una disminución en las especies reactivas de oxígenos (ROS) (Stefani *et al* 2006, Buendia *et al* 2015b, Pasqualetti *et al* 2015). La relación entre esos dos efectos y la activación de EpoR se demostró a través del silenciamiento de EpoR en astrogliá, usando técnicas de siRNA (Lourhmati *et al* 2013, Zhou & Yu 2013) y también, usando experimentos con células PC12 donde se demostró el efecto neuroprotector de Epo frente a la toxicidad inducida por Aβ (Ma *et al* 2009). Diversos estudios han mostrado que los efectos citoprotectores de Epo son dependientes de la concentración y que están directamente relacionados con la activación de su receptor y de las vías de señalización asociadas, ya que en células que fueron tratadas con Aβ<sub>25-35</sub> y el inhibidor de PI3K específico LY294002, Epo no mostró un efecto neuroprotector (Ma *et al* 2009, Shen *et al* 2010, Shang *et al* 2012, Ma *et al* 2014). Además, Epo incrementa la fosforilación de la kinasa glicógeno sintasa 3 beta (GSK-3β), vía PI3K/AKT, causando su inhibición (Zhou & Yu 2013). Estos datos sugieren un mecanismo de neuroprotección activado por Epo frente a la apoptosis inducida por Aβ<sub>25-35</sub> (Ma *et al* 2014). Adicionalmente, los tratamientos con Epo inducen la

sobre-expresión de Bcl-2, contribuyendo a la citoprotección frente a la neurotoxicidad provocada por A $\beta$  (Zhou & Yu 2013, Jia *et al* 2014, Ma *et al* 2014). Epo también genera efectos citoprotectores y antiapoptóticos en la línea celular de microglia EOC2, manteniendo el nivel de expresión de Wnt1, que disminuye con exposición a A $\beta_{42}$  (24 hr, 10 $\mu$ M), efecto que está directamente relacionado a la activación PI3K (Shang *et al* 2012). Wnt1 regula la cascada apoptótica mediante la mantención del potencial de membrana mitocondrial, fosforilando e induciendo la traslocación de Bad desde la mitocondria al citoplasma, bloqueando la formación del complejo Bad/Bcl-xL, incrementando la formación del complejo Bcl-xL/Bax, y bloqueando la activación de caspasa 1 y 3 a través de Bcl-xL, lo que explica la relación entre el efecto antiapoptótico de Epo, y la regulación de Wnt1 (Maiese *et al* 2005, Maiese *et al* 2012).

El EpoR también participa en la mantención del crecimiento de neuritas durante la neurogénesis de las células hipocámpales, y además disminuye la apoptosis en células del giro dentado en un modelo de Alzheimer (Arabpoor *et al* 2012). Sin embargo, en el hipocampo, el efecto neuroprotector de Epo es selectivo para mejorar la memoria, ya que no se observaron efectos positivos en el control de la ansiedad, comportamiento exploratorio o el control motor (Adamcio *et al* 2008).

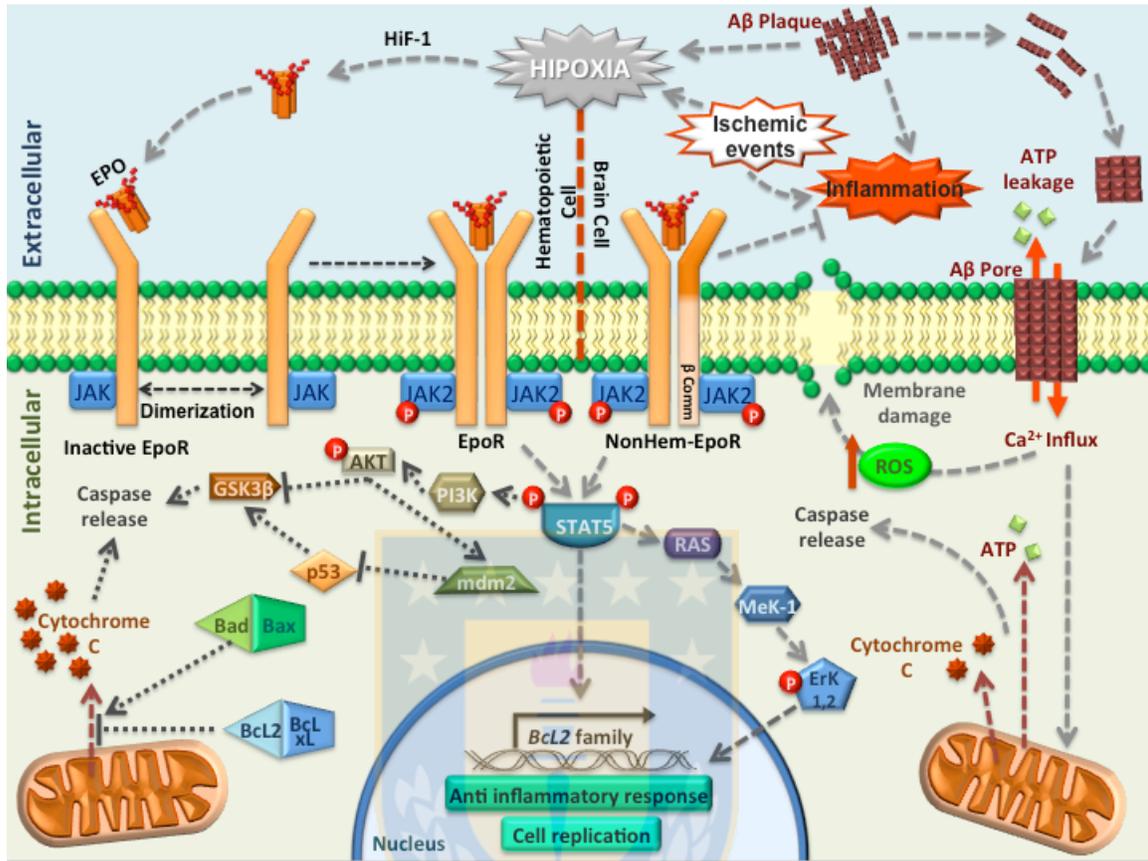
Además, la disminución de la peroxidación lipídica en muestras de cerebros de modelos animales para AD tratados con Epo se correlaciona con un incremento en los niveles de Bax (Chen *et al* 2015). Epo induce la síntesis selectiva de la proteína neuroglobina en las regiones dañadas, promoviendo la angiogénesis y

protección del endotelio vascular, factores clave que contribuyen a la neurogénesis y neuroplasticidad en el tejido cerebral dañado (Ding *et al* 2016, Maiese 2016b, Maiese 2016c).

De acuerdo con los resultados previamente comentados, los tratamientos de Epo en el modelo transgénico de AD A $\beta$ PP/PS1, muestran una reducción de alrededor del 20% en las áreas positivas para placas de A $\beta$ , después de un tratamiento de 4 semanas con Epo (2500-5000 UI/kg, i.p.) durante 3 días/semana (Armand-Ugon *et al* 2015). Esta evidencia además se correlaciona con resultados que muestran una mejora significativa en el comportamiento cognitivo de los ratones en la prueba de *V-maze* (Armand-Ugon *et al* 2015, Ott *et al* 2015).

Otras investigaciones sugieren que Epo recupera la actividad GSK-3 $\beta$ , que es inhibida por A $\beta$ <sub>42</sub>, sugiriendo otro mecanismo involucrado en la neuroprotección de Epo (Gan *et al* 2012, Li *et al* 2015, Ponce *et al* 2013).

Toda esta evidencia sugiere la idea que el efecto de Epo es mediado por la activación de EpoR en diferentes regiones como el hipocampo, representando un nuevo blanco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, mediante la activación de vías de señalización que bloquean la apoptosis reduciendo el daño inducido por diferentes tipos de estrés, como el aumento de estrés oxidativo de los eventos isquémicos cerebrales o la inflamación crónica característica de las enfermedades neurodegenerativas (Figura 3).



**Figura 3 Vías de señalización activadas por Epo en diferentes condiciones de estrés:**

Esquema que señala las principales vías de señalización activadas luego de la unión de Epo a su receptor (EpoR) en tejido eritroide (izquierda) o en tejido nervioso (derecha) en condiciones de estrés mediado por hipoxia, inflamación o por enfermedades neurodegenerativas. Extraído de *Castillo et al, 2017*.

### **Uso clínico de la hormona Eritropoyetina.**

La eritropoyetina humana recombinante (rhEpo) se aplica como tratamiento a pacientes con anemia, y en enfermedades asociadas a bajos niveles de Epo en plasma (Sargin *et al* 2010, Sargin *et al* 2011, Jiang *et al* 2014).

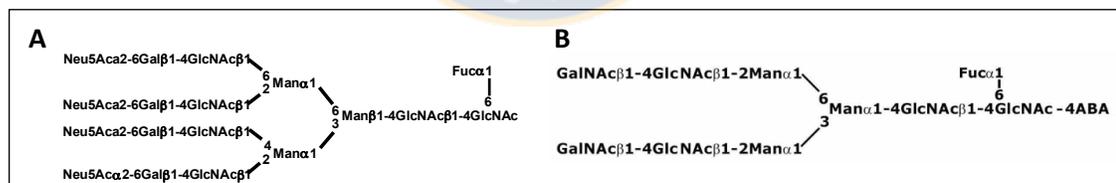
La producción de rhEpo, se desarrolla con el método más utilizado para la producción de proteínas recombinantes que implica el uso de cultivos de células de mamíferos como biorreactores, en el caso de Epo se usan células de ovario de hámster chino (CHO) (Jiang *et al* 2014). Este es un sistema de alto costo y baja eficiencia (Sargin *et al* 2011, Jiang *et al* 2014).

Considerando lo anterior, en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción se ha diseñado un sistema de producción alternativo y altamente eficiente para la obtención de Epo, usando un sistema de transducción directa de glándula mamaria con vectores adenovirales que contienen la región génica de Epo humana, llegando a obtener una producción de hasta (2 gr/L) (Toledo *et al.*, 2006). Este sistema produce una variante de Epo que ha sido caracterizada, observándose que posee un bajo nivel de glicosilación, principalmente biantenarico y carente de ácido siálico (EpoL) similar a la descrita para SNC (Figura 3). Estas diferencias tienen un efecto directo en la disminución de su actividad hematopoyética (Montesino *et al.* 2008), lo que es consistente con lo anteriormente descrito, además la EpoL tiene como principal ventaja su forma de producción altamente eficiente. (Brines *et al.* 2008; Rabie *et al.* 2008; Schmidt *et al.* 2008; Pankratova *et al.* 2010; (Pankratova *et al* 2010, Pankratova *et al*

2012)Pankratova et al. 2012; Trincavelli et al. 2013). El patrón de glicosilación menor de EpoL, también se relaciona con la afinidad a su receptor, aumentándola, lo que podría incrementar sus propiedades citoprotectoras, mediadas por la activación del receptor.

Lo anterior potencia el estudio y futuro uso farmacológico de EpoL para prevenir la muerte neuronal en enfermedades asociadas al SNC, como las patologías relacionadas a isquemia e inflamación.

Por lo tanto, el objetivo central de este trabajo es estudiar el efecto neuroprotector de la variante EpoL en comparación con Epo nativa, usando modelos de estrés asociados a isquemia e inflamación.



**Figura 4 Diferencia en patrón de glicosilación entre Epo y EpoL:**

En A se observa un esquema que muestra la estructura tetraantenaria típica de Epo circulante en plasma y de rhEpo. En B se observa el patrón de glicosilación obtenido en EpoL, mayoritariamente bi antenarario y asialilado (Extraído y modificado de Montesino et al, 2008).

## II. HIPÓTESIS

“La variante recombinante de eritropoyetina humana con un patrón de glicosilación bi- antenaria y asialilada (EpoL) tiene un efecto neuroprotector, en modelos in vitro de estrés oxidativo y estrés mediado por A $\beta$ , sin alterar el hematocrito”



### III. OBJETIVOS

**Objetivo General:** Caracterizar los mecanismos del efecto neuroprotector mediado por la variante EpoL, comparándola con la variante hematopoyética, y evaluar la interacción con su receptor en modelos de estrés asociados a enfermedades con potencial inflamatorio.

**Objetivo específico 1:** *Evaluar in vivo la actividad hematopoyética de EpoL con respecto a Epo.*

**Objetivo específico 2:** *Caracterizar el efecto neuroprotector de pretratamientos con EpoL y Epo en modelos celulares, frente a estrés inducido por agentes oxidativos y péptido  $\beta$ -amiloide.*

**Objetivo específico 3:** *Evaluar posibles diferencias en la interacción de ambas isoformas de eritropoyetina con su receptor, mediante modelaciones in silico.*

**Objetivo específico 4:** *Evaluar el efecto neuroprotector de EpoL sobre flujos transitorios de calcio intracelular y proteína SV2, utilizando modelos neuronales tratados con péptido  $\beta$ -amiloide.*

**Objetivo específico 5:** *Analizar el efecto neuroprotector de EpoL versus Epo y las vías de señalización asociadas, utilizando modelos ex vivo de cultivos organotípicos de hipocampo de rata.*

## **IV. METODOLOGÍA**

### **1 Expresión y purificación de Epo:**

La eritropoyetina humana recombinante fue obtenida de una línea celular establemente transformada de ovario de hámster chino (CHO; ATCC CCL-61, USA), procedentes del Centro de Inmunología Molecular (CIM), Cuba. Para su purificación se siguió el procedimiento estándar de lotes comerciales de la hormona.

### **2 Obtención de EpoL a partir de glándula mamaria de cabra:**

La EpoL se obtuvo a partir de la transducción adenoviral de la glándula mamaria de cabras, en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción. La metodología de obtención y caracterización se realizó según (Toledo *et al* 2006; Montesino *et al* 2008). Todos los procedimientos que involucren animales están autorizados por el comité de bioética de la Universidad de Concepción.

### **3 Actividad hematopoyética:**

Se utilizaron hembras de ratones normocíticas (*Mus musculus*) de la línea C57BL/6 de 7 semanas de edad, y 31 gr de peso aproximadamente, de acuerdo al método previamente descrito (Toledo *et al* 2006). Se generaron grupos experimentales de 5 animales cada uno y se realizaron tres inyecciones, inoculando 88 µg/kg de Epo o EpoL por vía intravenosa, con un intervalo de tres días entre cada inyección. Se tomaron muestras de sangre (60µL

aproximadamente) por vía retro-orbital en el día 0 (previo al tratamiento), en el día 5, 10, 15 y 20 post-tratamiento. El porcentaje de hematocrito se midió en capilares de vidrio de 70 mm de longitud y 1,55 mm de diámetro utilizando una centrifuga con rotor graduado para hematocrito. Se incluyó en el ensayo un grupo control negativo tratado con el vehículo. La actividad hematopoyética fue expresada como el incremento diferencial de los tratamientos con Epo o EpoL en comparación con el grupo de control negativo y los datos fueron analizados usando *two-way* ANOVA, y test de Sidak.

#### **4 Cultivo celular:**

##### **4.1 Línea celular pheochromocytoma of the rat adrenal medulla (PC-12):**

Las células se cultivaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF, 5%), Suero de Caballo (HS, 5%), L-Glutamina (2mM) y con una mezcla de antibióticos Estreptomicina/Penicilina (1%), manteniéndose en incubadoras de cultivo celular (Nuaire, EE.UU.) a 37°C, humedad relativa del 95% y CO<sub>2</sub> al 5%.

##### **4.2 Cultivos primarios de neuronas de corteza de rata:**

Las cortezas se obtuvieron de embriones de ratas *Sprague-Dawley* de 18 días de gestación. Las ratas preñadas fueron anestesiadas en cámara con CO<sub>2</sub> y sacrificadas por dislocación cervical. Los embriones extraídos fueron decapitados, disectando las cortezas cerebrales. Las neuronas fueron sembradas en placas pre-tratadas con poli-lisina a una densidad de 250.000 células/mL y mantenidas en medio DMEM, suplementado con HS (10%), DNasa (4 µg/ml) a 37°C con 5% de

CO<sub>2</sub>. Además durante las primeras 24 h el medio se suplementó con L-Glutamina (2mM).

### **5 Ensayos de pretratamientos con Epo y EpoL:**

Las células PC-12 fueron pretratadas con Epo o EpoL por 1 h y luego estresadas con *carbonyl cyanide-4-(tri uoromethoxy) phenylhydrazone* (FCCP) (60µM), un agente desacoplante de la cadena respiratoria de electrones que induce estrés oxidativo durante 3hrs o 1 hr. También se utilizó un modelo de estrés oxidativo más fuerte, tratando las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80µM) durante 45 mins y previamente tratadas con Epo o EpoL a las concentraciones neuroprotectoras correspondientes para cada caso, las que fueron determinadas en ensayos de viabilidad previos con concentraciones crecientes de la molécula. Para los tratamientos con oligómeros del peptide β-amiloide, se trataron las células durante 24h (1µM) y en co-incubación con Epo o EpoL a las concentraciones neuroprotectoras correspondientes para cada caso, previamente determinadas. Para evaluar la participación de vías de señalización en estos ensayos se usó: AG490 (0,5µM) como inhibidor de la vía JAK/STAT, el que se incubó durante 30 mins previo al pretratamientos con Epo o EpoL. Además se hicieron tratamientos con un anticuerpo anti-EpoR (1:200) para bloquear la interacción entre las variantes de la hormona y el receptor. Posteriormente se cuantificó el porcentaje de células vivas para todos los tipos de tratamientos.

## **6 Ensayos de viabilidad celular:**

Los cultivos celulares de PC-12 fueron sembrados a una densidad de 90000 células/pocillo y usadas 24 hrs después. Luego de tratar las células para cada condición, fueron incubadas con (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro) o MTT (1mg/ml) en PBS, por 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego se retiró el sobrenadante y se agregaron 50 µL de isopropanol por 15 mins, a 37°C para disolver las sales de formazán precipitadas, que se formaron cuando las deshidrogenasas de la célula viva clivaron el anillo tetrazolium de MTT. La medición se realizó a una longitud de onda de 560 nm y 620 nm y la diferencia se cuantificó usando el software del lector de multiplacas NOVOstar (BGM, Alemania).

## **7 Western blot:**

Luego de los tratamientos establecidos, las células fueron homogenizadas con buffer de lisis RIPA (ThermoFisher Scientific) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1%NP-40, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS; pH 7,4) conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas de las muestras fue cuantificada utilizando un kit de ensayo de BCA (Bicinchoninic Acid, Thermo Scientific). Usando cantidades iguales de proteína por cada muestra, se separaron mediante electroforesis en gel de SDS/Acrilamida. Se agregó primero el gel separador al 10% (Acrilamida/Bisacrilamida 10%, Tris-HCl 1,5 M pH: 8,5, SDS 10%, persulfato de amonio 10%, N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina o TEMED 5 µL) y luego el gel concentrador de Acrilamida al 5% (Acrilamida/Bisacrilamida 5%,

SDS 10%, Tris-HCl 0,5M pH: 6,8, persulfato de amonio 10%, TEMED 15  $\mu$ l). La electroforesis se desarrolló a 100V constante durante 100 min. Luego las proteínas separadas por peso molecular fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). El gel fue colocado en contacto directo con la membrana de PVDF, humedecidos en tampón de transferencia y transferido en una cámara en semi-seco (Bio-Rad). Para la inmunodetección, las membranas de PVDF fueron bloqueadas por 1 hr en leche al 5% en TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4), y luego incubadas por 18 h con el anticuerpo primario correspondiente, a una dilución optimizada para cada uno de ellos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti-EpoR 1:500 (Santa Cruz, Biotechnology,USA), anti-Bcl-2 1:1000 (Santa Cruz, Biotechnology,USA), anti-Hox-1 1:1000 (Santa Cruz, Biotechnology,USA), anti- $\beta$ -actina 1:1000 (Santa Cruz, Biotechnology,USA) y anti- $\alpha$ -tubulina 1:1000 (Santa Cruz, Biotechnology,USA). Posterior a la incubación con anticuerpos primarios, las membranas se lavaron en TBS-Tween 20 al 0,05% y se incubaron por 2 h con anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos Alexa Fluor® 680 y Alexa Fluor® 790 (Jackson,USA) diluidos 1:5000. Finalmente, las membranas se lavaron en TBS-Tween 20 al 0,05% y fueron visualizadas en el equipo de detección infrarroja Odyssey CLx (LI-COR). Las imágenes fueron procesadas con el programa Image Studio. En algunos casos, se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas utilizando el programa ImageJ.

## **8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR):**

Se aisló el ARN total celular de los cultivos tratados con las diferentes variantes de Epo con Trizol (Sigma,USA). El ARN extraído fue cuantificado por absorciometría UV en un espectrofotómetro Agilent 8453 y se evaluó la integridad del ARN por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se evaluaron los niveles de expresión de los genes, utilizando el kit Brilliant II SYBR Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, EE.UU). Las condiciones de reacción fueron de 95°C por 1 min, seguida por 40 ciclos integrados por: una etapa de denaturación de 95°C por 30 seg, una etapa de alineamiento de 1 minuto a temperatura variable y una etapa de elongación de 1 minuto a 68°C. La concentración de magnesio de la reacción y la temperatura de alineamiento fueron optimizadas para cada par de partidores. Como normalizador y calibrador se utilizó  $\beta$ -actina. La cuantificación relativa de los productos de PCR se calculó usando el método de comparación de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Braun et al., 2007) con el software MxPro3000P. (Partidores: Bcl-xL Fd:CCTCCCGACCTATGATACAAAAG, Rv: CTGGGTCTGCTCTGTGTTTAG; Bax Fd:GGCGAATTGGAGATGAACTG, Rv: CCCAGTTGAAGTTGCCAT; Bcl-2 Fd: GATGACTGAGTACCTGAACCG, Rv: CAGAGACAGCCAGGAGAAATC;  $\beta$ -actina Fd: ACTTTCTACAATGAGCTGCG, Rv: CTGGATGGCTACGTACATGG.). La visualización de los productos de PCR fue realizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, marcados con bromuro de etidio y observado en un transiluminador FBTN-816 (FisherBiotech, USA).

### **9 Inmunofluorescencia de cultivos neuronales:**

Cultivos neuronales (10 a 13 DIV) control y tratados fueron fijados en paraformaldehído PFA al 4% disuelto en PBS, por 30 min y lavadas en PBS 1x. A continuación fueron permeabilizadas con tritón X-100 al 0.3 % V/V en PBS por 15 min y bloqueadas por 1 h con suero de caballo (1:10 Hyclone, USA). Luego se incubaron los distintos anticuerpos primarios (anti-MAP-2, Santa Cruz Biotech. en dilución 1:200, hecho en rabbit y anti-SV2, en dilución 1:200, hecho en mouse) por 12h y secundarios apropiados conjugados con FITC, para anti-mouse (ExMax/EmMax = 500/517 nm), y Cy3 para anti-rabbit (ExMax/EmMax = 545/570 nm) o Cy5 (ExMax/EmMax = 649/670 nm) (1:400, Jackson, ImmunoResearch Labs). Finalmente fueron montados usando medio de montaje (DAKO, Agilent, USA) para preservar señal fluorescente. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal LSM 700 Zeiss y el análisis de las imágenes fue realizado utilizando el software Image J con el complemento Deconvolución para procesar las imágenes de cuantificación de SV2 en cultivos neuronales primarios y el complemento Neuron para cuantificar los cambios morfológicos de Iba-1 y GFAP en cultivos organotípicos de hipocampo (NIH; USA).

### **10 Evaluación de la frecuencia de flujos transientes de $Ca^{+2}$ intracelular en cultivos neuronales:**

Cultivos neuronales (10-13 DIV) fueron incubados por 30 min a 37°C con Fluo4-AM (5µM DMSO, Molecular Probes, USA), en PBS 1x, lavados por 30 min a 37°C, y lavados 3 veces con Solución Externa (150mM NaCl, 5,4mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>,

1,0mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM glucosa, 10mM HEPES (pH 7.4), con osmolaridad ajustada a 300 mOsm) a temperatura ambiente (22-25°C) y luego colocadas en el microscopio invertido de fluorescencia (Eclipse TE, Nikon USA). El microscopio está equipado con una lámpara de Xenón, objetivo de 40X, una rueda de filtros Lambda 10-2 (Sutter Instruments, USA) controlada por el *software* Axon Workbench 2.2 (Axon Instruments), además el microscopio tiene acoplado una cámara CCD de 12 bits (SensiCam, PCO, Alemania). Se seleccionaron regiones de interés (ROIs) correspondientes a las regiones somáticas de las neuronas y se determinó la frecuencia de flujo transiente de Ca<sup>+2</sup> intracelular en neuronas control y en las tratadas, fueron registradas cada 1 segundo (iluminadas por 200 ms), con un tiempo máximo de 200 segundos por campo. La frecuencia de flujo transiente de Ca<sup>+2</sup> (Hz) fue cuantificada como porcentaje, considerando el promedio de las neuronas control, como el 100%.

### **11 Modelación *in silico* de las variantes de glicosilación y docking molecular con EpoR y NonHem-EpoR:**

Los modelos de las variantes glicosiladas de Epo se generaron usando la estructura cristalográfica de Epo (PDB: 1EER), donde las mutaciones K24N, K38N y K83N fueron creadas para restablecer los sitios de glicosilación en Epo, usando el programa Modeller 9.15. Los oligosacáridos tetra-antenarios para Epo *wild type* (Epo) y bi-antenarios para la L-glicosilada (EpoL), fueron creados usando el programa SWEET2 (<http://www.glycosciences.de/modeling/sweet2/doc/index.php>). Las N-glicosilaciones fueron modeladas para cada variante usando Maestro

(Schrödinger, LLC, Nwe York, USA, 2016). El receptor NonHem-EpoR fue creado conservando una cadena del EpoR y una de la subunidad  $\beta$  común del receptor de citoquinas (PDB:2GYS). Los complejos Epo-EpoR y Epo-NonHem-EpoR fueron generados por docking usando ZDock (ref), optimizado en MacroModel y finalmente analizado energéticamente con Prime (Schrödinger, LLC, Nwe York, USA, 2016). El análisis de interacción superficial fue hecho usando InterSurfPro (<http://curie.utmb.edu/usercomplex.html>). Las imágenes y superficies moleculares fueron creados por Py-Mol (versión 1.5, DeLano Scientific LLC).

### **12 Extracción de rebanadas de hipocampo de rata:**

Se usaron ratas (*Sprague Dawley*) machos de 3-4 meses de edad (275-325 g). Los animales fueron decapitados utilizando una solución anestésica de fentobarbital (60mg/Kg, i.p.). Los cerebros fueron removidos del cráneo y colocados en una solución fría de Krebs, correspondiente al tampón de disección (NaCl 120mM, KCl 1mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, NaHCO<sub>3</sub> 26mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18mM, glucosa 11mM y sacarosa 200mM a pH 7,4). Las soluciones fueron previamente burbujeadas con una mezcla gaseosa de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> durante 45 mins antes de la inmersión para asegurar la saturación de O<sub>2</sub>. El hipocampo fue disectado en rebanadas de 300 $\mu$ M usando un McIlwain Tissue Chopper (Campden Instruments, UK) y transferido a un recipiente con el mismo tampón de disección sin sacarosa y burbujeadado con 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> en un baño de agua por 45 mins a 34°C, para recuperar el tejido del daño producido al hacer las rebanadas antes de

comenzar los experimentos (período de equilibrio). Los cortes pertenecientes al grupo basal fueron incubados durante todo el experimento con una solución tampón de Krebs: NaCl 120 mM, KCl 2mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,19mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18mM y glucosa 11mM, pH 7,4, equilibrado con 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Las rebanadas que pertenecen al grupo de privación de oxígeno y glucosa (OGD) fueron tratadas con un tampón que fue saturado con 95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> y con 2-deoxyglucosa en reemplazo de glucosa. Luego del período OGD, las rebanadas fueron devueltas a un tampón de Krebs oxigenado que contiene glucosa durante 2 hrs (período de reoxigenación). Los grupos de rebanadas tratados con diferentes concentraciones de Epo, EpoL o EpoL+ Ab(1:200) fueron tratados por 15 mins con OGD y posteriormente los compuestos fueron agregados en el período de reoxigenación. Todos los experimentos con rebanadas de hipocampo fueron realizados en el Departamento de Farmacología de la Universidad Autónoma de Madrid, España, bajo las condiciones del comité de Bioética correspondiente.

### **13 Determinación de células vivas en rebanadas de hipocampo:**

Las rebanadas de hipocampo fueron colectadas inmediatamente después del período de reoxigenación y fueron incubadas en una solución con MTT (0,5 mg/mL) en un tampón de Krebs Bicarbonato a 37°C por 30 mins en una placa de 96 pocillos. Los productos de formazán generados en las rebanadas fueron solubilizados agregando 200 µL de dimethyl sulfoxido (DMSO) por pocillo, y a

continuación fue medida la absorbancia en un lector de microplacas a 540/570 nm (Thermo iEMS reader MF, USA). Los valores de absorbancia obtenidos en las rebanadas control corresponden al 100% de la viabilidad.

#### **14 Medición del estrés oxidativo y muerte celular mediante fluorescencia:**

Al finalizar los experimentos de OGD o de A $\beta$  en cultivos organotípicos y tratamientos con Epo, EpoL y EpoL+Ab, las rebanadas y cultivos fueron incubadas durante 30 mins con 1 $\mu$ g/mL de yoduro de propidio (PI) para evaluar muerte celular, 5 $\mu$ M de diclorofluoresceína-diacetato (DCF-DA) para evaluar la variación en especies reactivas del oxígeno (ROS) y con Hoechst (1 $\mu$ g/mL) para observar los núcleos de todas las células del tejido. El promedio de cada señal fluorescente en la zona de CA1 (PI: rojo; DCF-DA: verde; Hoechst: azul) fue corregido por la señal de Hoechst en cada rebanada. La señal fluorescente se analizó en un microscopio invertido NIKON eclipse T2000-U microscope (USA). La longitud de onda de excitación y emisión para PI/Hoechst fueron: 530/350 o 580/460, respectivamente. Las imágenes se tomaron en la región CA1 del hipocampo, usando magnificaciones de 100x y el análisis de fluorescencia se hizo utilizando el programa ImageJ. La muerte celular se calculó como el promedio de PI/Hoechst o DCF-DA/Hoechst; los datos fueron normalizados en porcentaje con respecto a los valores basales en las rebanadas y cultivos control.

### **15 Preparación de cultivos organotípicos de hipocampo:**

Las rebanadas de hipocampo para cultivos organotípicos se obtuvieron de cerebros de crías de ratas de 8-11 días (*Sprague Dawley*). Los cultivos se prepararon con rebanadas de 300  $\mu\text{m}$  que fueron separadas en recipientes a 4°C con una solución salina balanceada de Hank (HBSS) compuesta por: glucosa 15mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3mM, KCl 5,36mM, NaCl 137,93mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,34mM,  $\text{MgCl}_2$  0,49 mM,  $\text{MgSO}_4$  0,44mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,1mM, HEPES 25 mM, 100 U/mL de penicilina y 0,1mg/mL de gentamicina. Cuatro rebanadas se colocaron en un inserto para cultivo celular Millicell-0,4 $\mu\text{m}$  (Millipore, España) en una placa de cultivo celular de 6 pocillos. Se mantuvieron por 4 días en crecimiento antes de aplicar los diferentes tratamientos. El medio de cultivo se compuso de 50% de medio mínimo esencial (MEM), 25% de HBSS, y 25% de suero de caballo (Life Technologies, España). Después de 4 días en cultivo se trataron con A $\beta$  (Sigma-Aldrich, España), o en asociación con Epo, EpoL o EpoL+Ab. Los cultivos crecieron a 37°C y con 5%  $\text{CO}_2$  y el medio fue cambiado 2 veces a la semana.

### **16 Inmunofluorescencia de cultivos organotípicos de hipocampo:**

Los cultivos fueron fijados usando paraformaldehído al 4% durante 1 hr a 22-25°C, con volúmen suficiente para cubrir el inserto con las 4 rebanadas de hipocampo (1mL). Se hicieron lavados con tampón fosfato salino (PBS) 1x y se separaron las muestras del inserto, para continuar el procedimiento por inmersión de las rebanadas. La permeabilización se hizo con una solución de PBS-Tritón 0,1%

durante 30 mins. La solución de bloqueo PBS-Tritón 0,1%/ Albúmina de suero bovino (BSA) 1%, suero de cabra 1% se incubó por 2 hr y los anticuerpos primarios fueron incubados en la misma solución durante 12 hr a 4°C (anti-GFAP, anti-IBA-1 1 ambos en dilución 1:1000). Los anticuerpos secundarios fueron incubados por 2 hrs, usando la misma solución y el montaje se hizo usando la solución Dako (Agilent, Dinamarca) (DAPI 300µm, secundarios conjugados con FITC, para anti-mouse, y Cy3 para anti-rabbit o Cy5, dilución 1:500, Jackson, ImmunoResearch Labs, USA). Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal LSM 700 Zeiss y el análisis de las imágenes se hizo con el software Image J y el complemento Neuron (NIH; USA).

### **17 Análisis estadístico**

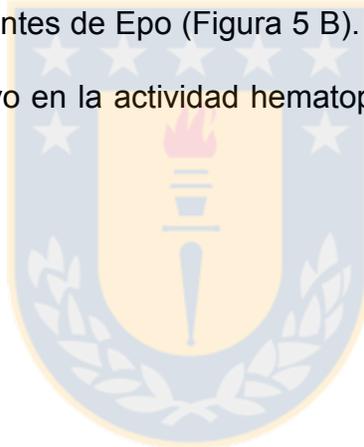
Los datos están representados como porcentajes del control y se graficó el promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico de los resultados se hizo con *One-way* ANOVA y el test post análisis de Tukey o Kruskal-Wallis/ Dunns, según correspondencia, de acuerdo a los test de distribución normal aplicados para cada grupo de análisis. Se consideraron estadísticamente significativos los resultados donde: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  *versus* células o rebanadas estresadas (FCCP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OGD o A $\beta$ ), + $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$ , +++ $p < 0,001$ , ++++ $p < 0,0001$  *versus* grupo control, # $p < 0,5$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  *versus* grupos estresados y tratados (+Epo, +EpoL, + Inhibidor).

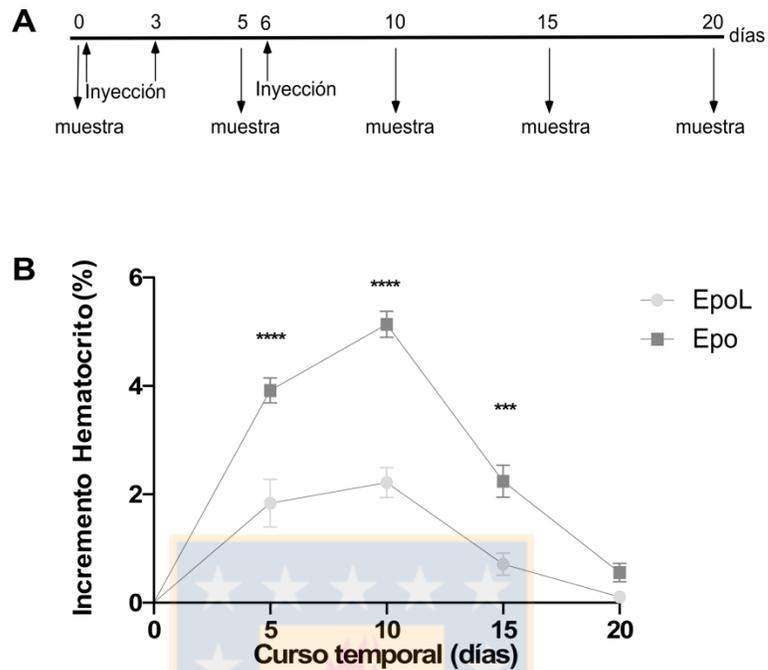
## V. RESULTADOS

### 1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA DE EPOL

#### 1.1 La variante EpoL no muestra actividad hematopoyética.

La actividad hematopoyética de EpoL fue evaluada *in vivo*, comparándola con la actividad de Epo recombinante humana en ratones normocíticos C57BL/6, durante 3 semanas en los días 0, 5, 10, 15 y 20 (Figura 5 A). Se observaron diferencias significativas en el incremento del porcentaje del hematocrito para animales tratados con ambas variantes de Epo (Figura 5 B). Sin embargo, EpoL no muestra un incremento significativo en la actividad hematopoyética con respecto al control ( $6,4\% \pm 0,82$ ,  $n=10$ ).





**Figura 5. Curso temporal del hematocrito en modelos murinos tratados con dos variantes de eritropoyetina humana recombinante:**

Epo y EpoL fueron administradas en ratones C57BL/6 normocíticos en dosis de 88µg/kg. A) Diseño experimental que señala los días de tratamiento y de toma de muestras. B) Porcentaje del hematocrito de que aumentó con respecto al control en t=0, durante los 20 días de experimento. Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM de incremento del hematocrito, n=10, *two way* ANOVA, Sidak test \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$  *versus* tratamiento con EpoL. Elaboración propia.

Considerando que EpoL mostró una baja actividad hematopoyética, no significativa, continuamos con el análisis y caracterización de sus propiedades neuroprotectoras, los cuales se realizaron utilizando el modelo celular PC12, que ha sido usado ampliamente como un modelo neuronal para estudios *in vitro* (Ma *et al* 2009).

## **2 CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES NEUROPROTECTORAS DE EPOL FRENTE A DIFERENTES ESTIMULOS QUE INDUCEN ESTRÉS OXIDATIVO**

### **2.1 El efecto neuroprotector de EpoL en células tratadas con FCCP depende de la activación de su receptor:**

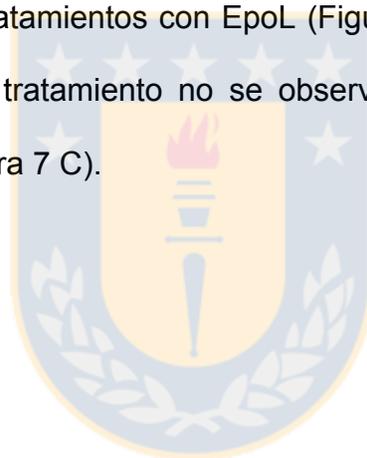
Considerando que variadas enfermedades asociadas al SNC como la hipoxia inducida por infarto cerebrovascular, o enfermedades neurodegenerativas aumentan el potencial oxidativo e inflamatorio en el parénquima cerebral (Terraneo *et al* 2017, Terraneo & Samaja 2017) evaluamos las propiedades neuroprotectoras de EpoL.

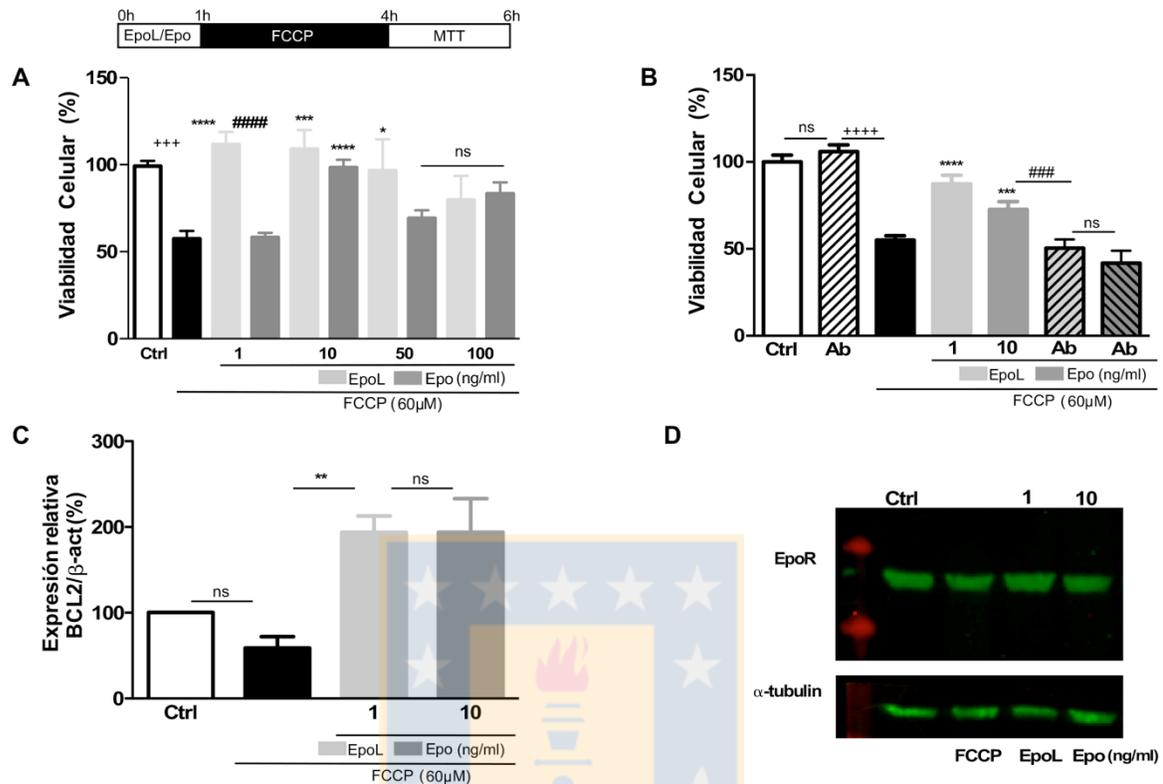
Como modelo de estrés se utilizaron células PC12 tratadas con FCCP (60 $\mu$ M) durante 3 hrs, lo que redujo la viabilidad a 57,4% ( $\pm$ 4,5), y lo consideramos como primer modelo *in vitro* de estrés oxidativo. Bajo estas condiciones, las células fueron tratadas con Epo o EpoL a concentraciones crecientes (1, 10, 50, 100 ng/mL) durante 1 hr previo al estímulo citotóxico, para determinar la concentración mínima efectiva de ambas variantes de la hormona en el modelo celular usado (Figura 6). EpoL mostró un efecto neuroprotector significativo del 54% ( $\pm$ 2,8), a una

concentración mínima de 1 ng/mL, mientras Epo mostró un efecto similar de 40,91% ( $\pm 0,0$ ) a una concentración 10 veces mayor (10 ng/mL). Además, el efecto neuroprotector máximo para Epo se observó a la concentración de 10 ng/mL y para EpoL 1 ng/mL (Figura 6 A). Para caracterizar este efecto, se evaluó la activación del EpoR en la neuroprotección mediada por la isoforma EpoL. Células PC12 fueron incubadas con un anticuerpo (Ab) de unión a EpoR (dilución de 1:200), bajo las mismas condiciones de pre-tratamiento antes mencionadas, y utilizando sólo las concentraciones mínimas efectivas para cada variante: EpoL 1ng/mL, Epo 10 ng/mL. El efecto neuroprotector de ambas variantes fue bloqueado en presencia del Ab anti-EpoR (Figura 6 B). Este resultado nos permite sugerir que el efecto neuroprotector de ambas variantes está mediado por la activación del mismo receptor.

Adicionalmente, se evaluó la activación de vías de señalización anti-apoptóticas, utilizando el mismo protocolo experimental. Ambas variantes tuvieron efecto neuroprotector sobre el estrés oxidativo inducido por FCCP, y el pre-tratamiento con ambas variantes induce un aumento en la expresión del transcrito del gen Bcl-2, que regula una de las vías anti-apoptóticas más descritas (Siddiqui *et al* 2015), y que concuerda con los efectos neuroprotectores observados previamente (Figura 6 C). Sin embargo, cuando evaluamos los niveles de expresión de EpoR mediante la técnica de *western blot*, utilizando las mismas condiciones experimentales, no se observaron cambios significativos en su expresión, lo que descarta que el efecto observado estuviera determinado por la sobre-expresión de

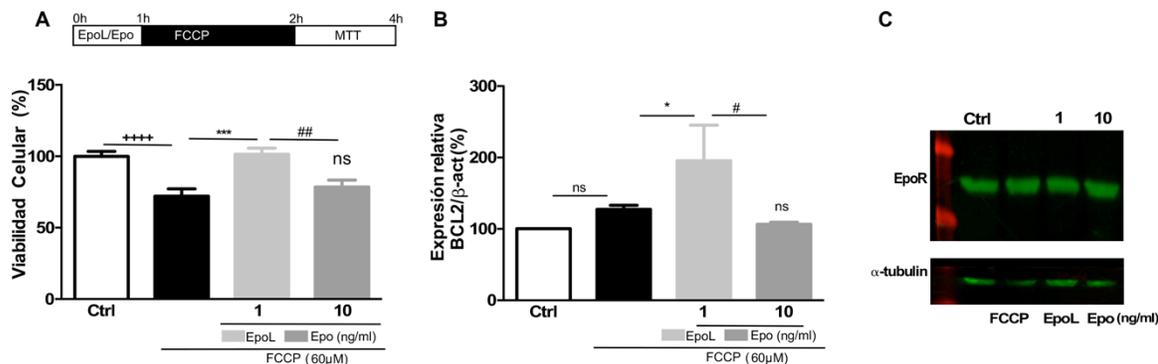
EpoR (Figura 6 D). Además, se analizó el efecto de estrés oxidativo durante 1 hr de tratamiento con FCCP, manteniendo el pre-tratamiento con las variantes Epo y EpoL. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto neuroprotector de ambas variantes de la hormona. Específicamente, EpoL mostró un efecto neuroprotector significativo del 29,47% ( $\pm 1$ ) a una concentración 10 veces menor de lo observado con la variante Epo (Figura 7 A). Este resultado se correlaciona con la sobreexpresión del transcrito de Bcl-2, inducida exclusivamente en los tratamientos con EpoL (Figura 7 B). Sin embargo, en esas mismas condiciones de tratamiento no se observó diferencia significativa en la expresión de EpoR (Figura 7 C).





**Figura 6 El efecto neuroprotector de EpoL en células PC12 tratadas con FCCP, depende de la activación de EpoR:**

(A) Ensayo de viabilidad celular en PC12 incubadas con Epo o EpoL a diferentes concentraciones durante 1 hr, y tratadas posteriormente con FCCP durante 3 hrs. El porcentaje de viabilidad celular fue evaluado usando MTT. (B) El mismo experimento, que incluye co-incubación con un anticuerpo de unión específico a EpoR (1:200). (C) Evaluación de la expresión relativa del transcrito de Bcl-2 mediante qRT-PCR, después de 3 hrs de co-tratamiento con FCCP y Epo o EpoL a la concentración más efectiva para cada una, se usó el gen  $\beta$ -actina como *housekeeping*. (D) *Western blot* de la expresión de EpoR a las mismas condiciones de co-tratamiento descritas en C, se usó el gen de  $\alpha$ -tubulina como normalizador. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM, n=5, usando *One-way ANOVA*, y test post análisis de Dunns\*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0001;\*\*\*\*: p < 0,0001 *versus* células PC12 tratadas con FCCP; +++++: p < 0,0001; +++: p < 0001 *versus* células control, #: p < 0,05; ##: p < 0,01; ###: p < 0001; #####: p < 0,0001 *versus* tratamientos con Epo o EpoL. Elaboración propia.



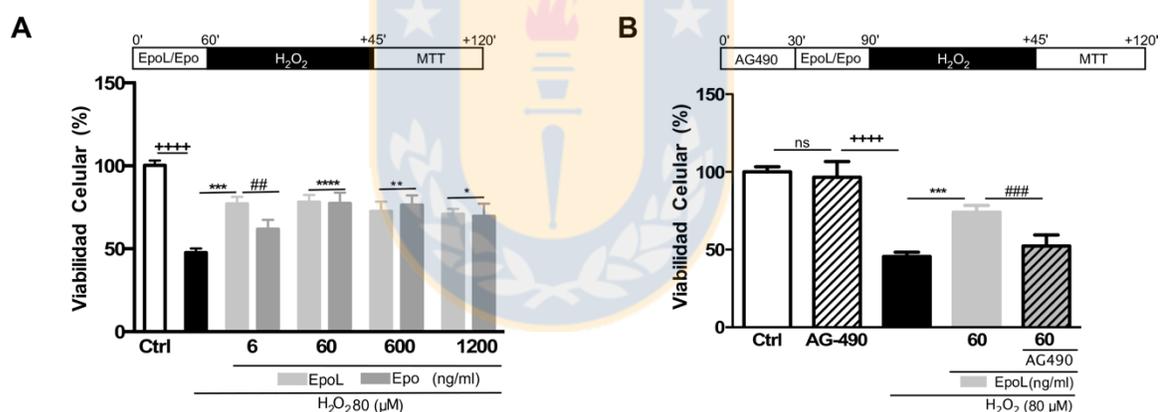
**Figura 7 Evaluación del efecto neuroprotector de variantes de Epo en condiciones de estrés oxidativo agudo:**

Células PC12 fueron co-incubadas con FCCP y EpoL o Epo a la concentración neuroprotectora mínima efectiva (1 y 10 ng/mL, respectivamente), durante 1 hr. (A) Ensayo de viabilidad celular mediante MTT (B) Evaluación de la expresión relativa del gen Bcl-2 mediante qRT\_PCR (C) *Western blot* de la expresión de EpoR. Valores representan la media  $\pm$  SEM. n = 5, usando *One-way ANOVA* y test postanálisis de Dunns \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0001;\*\*\*\*: p < 0,0001 *versus* PC12 tratadas con FCCP; +++++: p < 0,0001; ++++: p < 0001 *versus* células control, #: p < 0,05; ##: p < 0,01; ###: p < 0001; #####: p < 0,0001 *versus* tratamientos con Epo o EpoL. Elaboración propia.

## 2.2 El efecto neuroprotector de EpoL en células PC12 tratadas con peróxido de hidrógeno, depende de la activación de EpoR.

A continuación se evaluó si el efecto neuroprotector de EpoL se mantiene en condiciones de estrés oxidativo. Se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como un segundo agente estresante, y se determinó que al incubar las células con una concentración de 80  $\mu$ M durante 45 min, la viabilidad celular se redujo a un 52,71% ( $\pm$ 0,07). Usando estas condiciones experimentales, se evaluó la mínima concentración neuroprotectora de ambas variantes de Eritropoyetina, explorando nuevas concentraciones crecientes debido a que peróxido de hidrógeno es un estímulo oxidativo tóxico más potente que el previamente usado (6, 60, 600, 1200 ng/mL), durante 1 hr de pre-tratamiento (Figura 8). La variante de baja glicosilación mostró

un efecto neuroprotector de 24,5% ( $\pm 2,3$ ) a la concentración de 6 ng/mL. Esta concentración resultó 10 veces menor que la de Epo para ejercer el mismo efecto (60 ng/mL) (Figura 8 A). Para evaluar si este efecto está relacionado con las vías de activación inducidas por el receptor de Epo. Se replicaron los ensayos de viabilidad con la mínima concentración efectiva para EpoL, en presencia de un inhibidor de la vía JAK/STAT, (AG490 0,5  $\mu$ M) (Miljus *et al* 2014). El efecto neuroprotector inducido por EpoL se redujo significativamente al incubarse con el inhibidor; sugiriendo que necesita de la activación de JAK/STAT para inducir su efecto (Figura 8 B).



**Figura 8 El efecto neuroprotector de EpoL en células PC-12 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependen de la activación de su receptor:**

(A) Células PC-12 fueron incubadas con Epo o EpoL a diferentes concentraciones por 1 hr y luego fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 45 mins. (B) Células tratadas usando la concentración más efectiva de EpoL y el inhibidor de la vía Jak/Stat. Los valores son el promedio SEM. N=3, usando One-way ANOVA y el test postanálisis de Dunns \*:p<0,05 versus PC12 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; +++++:P<0,0001; ++++:P<0,001 versus control, #:p<0,05; ##:p<0,01;####:p<0,001; #####:p<0,0001 versus Epo, EpoL o tratamiento con AG490. Elaboración propia.

### 3 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE AMBAS VARIANTES GLICOSILADAS CON LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR

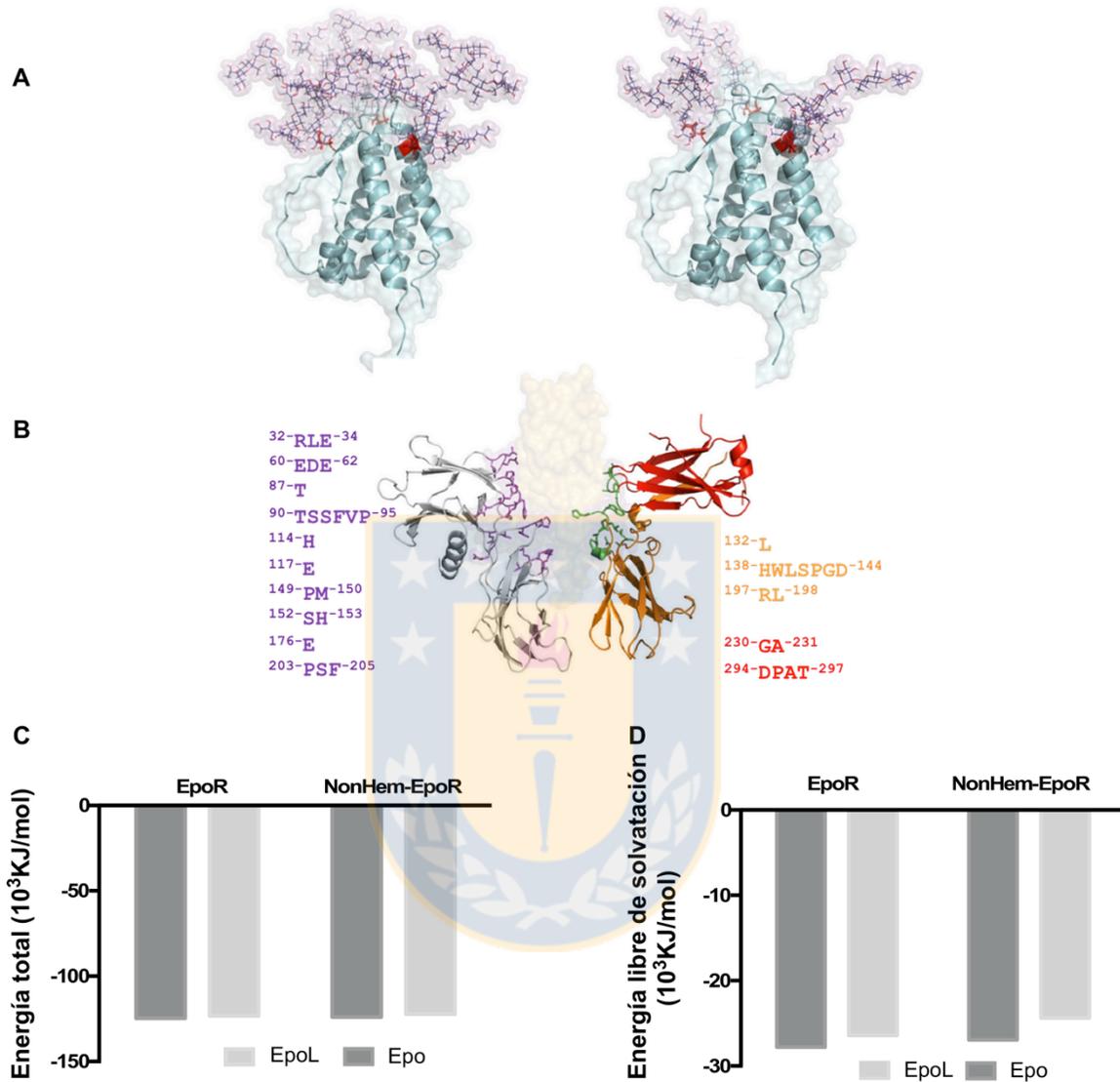
#### 3.1 Epo y EpoL interactúan con el receptor de la hormona expresado en cerebro:

Generamos dos modelos N-glicosilados de Epo que contienen: cadenas tetra-antennarias de glicosilaciones (Epo) y otro con cadenas bi-antennarias (EpoL). De estos modelos, observamos que los oligosacáridos no comprometen la región de unión con el receptor que fue predicha por docking, y que se conserva en la estructura Epo-EpoR. (Figura 9 A, izquierda). Las predicciones de docking se realizaron usando un modelo del receptor expresado en cerebro (NonHemEpoR), que contiene la subunidad CD131 y ambas variantes glicosiladas de Epo, donde se observó un sitio de unión y la formación de un complejo estable con ambas variantes (Figura 9 A, derecha).

Un análisis más detallado mostró que los aminoácidos involucrados en el complejo formado entre las dos variantes glicosiladas y ambas conformaciones del receptor, se definen como una región conservada e independiente de la variante de la hormona o de la conformación del receptor (Figura 9 B). El complejo Epo-NonHemEpoR muestra una energía total similar, al compararla con la que contiene el complejo que se forma con EpoR ( $-122.2 \times 10^3$  kJ/mol EpoL-NonHemEpoR,  $-124.0 \times 10^3$  kJ/mol Epo-NonHemEpoR *versus*  $-123.1 \times 10^3$  kJ/mol EpoL-EpoR,  $-124.7 \times 10^3$  kJ/mol Epo-EpoR). Esto confirma que la estructura de NonHemEpoR forma un complejo estable con Epo y EpoL (Figura 9 C). Además,

ambos receptores tienen valores similares de energía de solvatación ( $-24.4 \times 10^3$  kJ/mol EpoL-NoHem-EpoR,  $-26.9 \times 10^3$  kJ/mol Epo-NonHem-EpoR *versus*  $-26.4 \times 10^3$  kJ/mol EpoL-EpoR,  $-27.8 \times 10^3$  kJ/mol Epo-EpoR) (Figura 9 D), lo que está relacionado con una interacción favorable entre cada ligando y su receptor. Estos datos indican que el receptor no hematopoyético, presente en tejido cerebral, puede presentar un mecanismo de activación similar al descrito para EpoR clásico. Los resultados específicos de análisis se describen en la Tabla nº1.





**Figura 9 Modelo *in silico* de la interacción entre las variantes glicosiladas de eritropoyetina y su receptor:**

(A) Modelos de variantes de Epo (púrpura) y EpoL (celeste), generadas usando la estructura de Epo y EpoR (PDB:1EER) (panel derecho ambas subunidades en verde) o con NonHemEpoR (panel derecho cadena A y B de la región  $\beta$ -común en azul), respectivamente. (B) Aminoácidos importantes en la interacción entre cada variante y las diferentes isoformas del receptor. Para cada variante de Epo los aminoácidos detectados en la interfase con EpoR o NonHemEpoR están destacados en narajo o amarillo, mientras que los repetidos en ambas isoformas están resaltados en rojo. (C,D) Gráficos que resumen la energía total y la energía libre de solvatación, calculada a partir de los complejos formados entre las variantes de eritropoyetina y ambos receptores. Elaboración propia.

	Energía total (kJ/mol)	Elasticidad (kJ/mol)	Curvatura (kJ/mol)	Torsion (kJ/mol)	Torsion incorrecta (kJ/mol)	VdW (kJ/mol)	Electrostatica (kJ/mol)	Solvatacion (kJ/mol)
Epo	-37674.4	703.2	2629.9	8062.8	54.1	-1637.3	-36047.7	-11439.4
Epo L	-36402.5	514.4	1824.3	4805.5	52.9	-1857.3	-31488.1	-10254.3
Epo -EpoR	-124672.5	1554.5	6125.1	13055.1	171.3	-7585.4	-110209.7	-27783.4
Epo L -EpoR	-123130.2	1381.0	5250.5	9952.3	177.5	-7556.0	-105918.0	-26417.5
Epo – NonHem-EpoR	-123991.2	1553.2	6078.2	12594.6	177.2	-7521.1	-109934.7	-26938.5
Epo L – NonHem-EpoR	-122187.7	1379.6	5248.7	9392.5	175.4	-7668.4	-106345.6	-24369.9

**Tabla 1: Caracterización energética de variantes de eritropoyetina.**

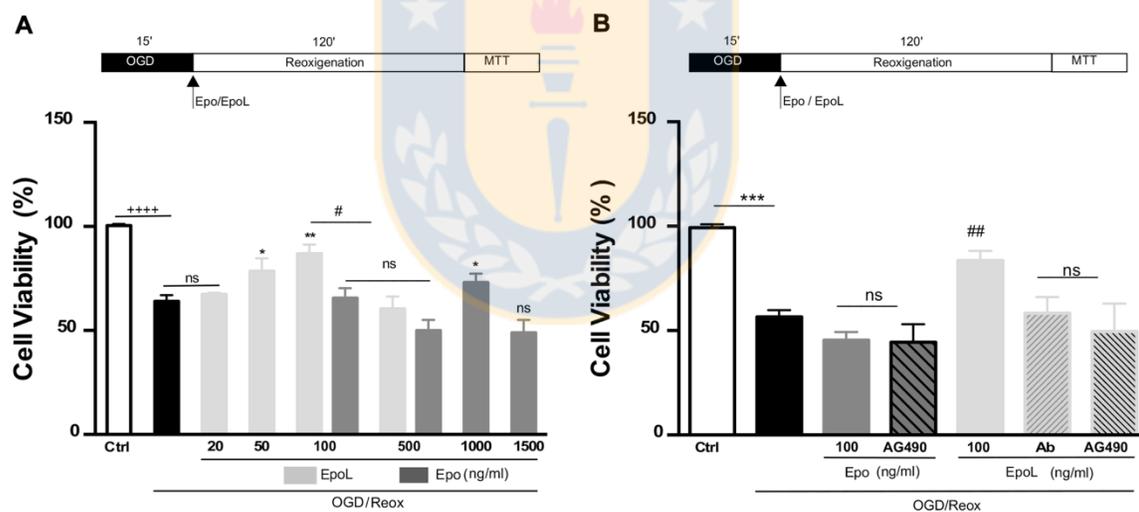
Caracterización energética de las variantes de eritropoyetina glicosilada y los complejos formados por interacción con sus respectivos receptores, obtenido usando el software *Prime*. Elaboración propia.

#### **4 EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EPO Y EPOL EN ESTRÉS OXIDATIVO USANDO MODELOS EX VIVO.**

##### **4.1 Efecto neuroprotector de Epo y EpoL en modelos ex vivo de hipocampo de rata.**

Después de modelar la interacción de Epo y EpoL con EpoR y NonHemEpoR, evaluamos si se mantuvo el efecto neuroprotector en tratamientos con Epo y EpoL posterior al proceso de injuria, en tejido cerebral, con la finalidad de evaluar un potencial uso *in vivo* de las variantes Epo y EpoL. Para esto, se utilizó un modelo *ex vivo* de rebanadas de hipocampo de rata (Buendía *et al* 2016). Las rebanadas fueron estresadas con un sistema de privación de oxígeno y glucosa (OGD) durante 15 min con una re-oxigenación consecutiva de 2 hrs. Para determinar la mínima concentración neuroprotectora de Epo o EpoL, las dos variantes fueron

incubadas en condiciones separadas durante la re-oxigenación (Figura 10). EpoL mostró un efecto neuroprotector significativo a una concentración de 50 ng/mL, a diferencia de lo observado para Epo en las mismas condiciones experimentales. El efecto máximo de EpoL se observó a 100 ng/mL, concentración 10 veces más baja que la necesaria para que Epo (1µg/mL) tuviera un efecto de neuroprotección máximo (Figura 10 A). Además, el efecto neuroprotector se perdió para ambas variantes (Figura 10 B) al bloquear la activación del receptor, utilizando un anticuerpo específico de unión, o usando un inhibidor de la vía de activación JAK/STAT.



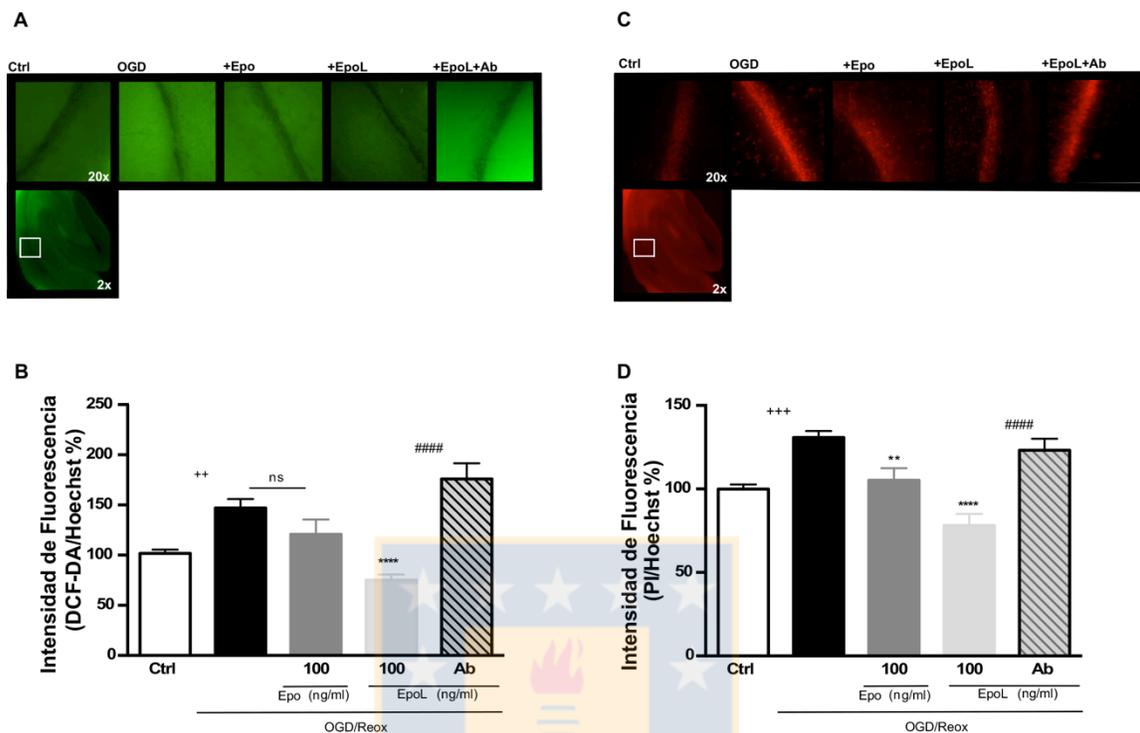
**Figura 10 El efecto neuroprotector de Epo y EpoL en rebanadas de hipocampo depende de la activación de EpoR:**

(A) Rebanadas de hipocampo de rata fueron incubadas con Epo o EpoL a diferentes concentraciones durante el tiempo de re-oxigenación para determinar la concentración más efectiva, evaluado por MTT. (B) Evaluación de la activación e interacción de Epo/EpoR en el efecto neuroprotector, usando un anticuerpo anti-EpoR (Ab,1:200) o el inhibidor JAK/STAT (AG490). Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM.  $n = 5$ , usando *One-way ANOVA* y test post análisis de Dunns \*:  $p < 0,05$  versus rebanadas de hipocampo con OGD. \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; +++:  $p < 0,001$  versus rebanadas control, #:  $p < 0,05$ ; ##:  $p < 0,01$ ; ###:  $p < 0,001$ ; ####:  $p < 0,0001$  versus tratamientos con Epo, EpoL, Ab o AG490. Elaboración propia.

#### **4.2 Caracterización del efecto neuroprotector de EpoL en rebanadas de hipocampo de rata.**

En este modelo existe un incremento del estrés oxidativo, por lo que se evaluó la variación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en rebanadas de hipocampo estresadas con OGD, usando la sonda fluorescente DCF-DA y también evaluamos la muerte celular con la tinción Ioduro de Propidio (PI) (Figura 11 A y 11 C, respectivamente). Los resultados obtenidos muestran que, a diferencia de lo que sucede con Epo, los tratamientos con EpoL durante la re-oxigenación, inducen una disminución en la producción de ROS, determinada por una disminución en la señal fluorescente de DCF-DA (Figura 11 B). Además, el porcentaje de células muertas representadas por la intensidad de señal de PI, disminuye para los tratamientos con EpoL, concordando con la evaluación de viabilidad celular mediante MTT (Figura 11 D).

Por otro lado, observamos que la señal de DCF-DA y de PI incrementan significativamente cuando las rebanadas de hipocampo fueron incubadas con anti-EpoR, sugiriendo que el efecto neuroprotector de EpoL en rebanadas de hipocampo también depende de la activación de EpoR.



**Figura 11 El efecto neuroprotector de EpoL en rebanadas de hipocampo está relacionado con la disminución de ROS:**

(A y C) Imágenes de fluorescencia de rebanadas de hipocampo de rata incubadas con Epo o EpoL durante la re-oxigenación posterior a OGD y luego incubadas con DCF-DA (verde) o PI (rojo). (B) Evaluación del estrés oxidativo en las áreas CA1, usando la señal (DCF-DA/Hoescht) analizados usando el software ImageJ. (D) Cuantificación de la muerte celular (células muertas/células totales), usando la señal (PI/Hoescht) y el software ImageJ. Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM.  $n = 7$ , usando *One-way* ANOVA y test post análisis de Dunns \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* *versus* rebanadas de hipocampo tratadas con OGD. ++:  $p < 0,01$ ; +++:  $p < 0,001$  *versus* rebanadas control, ####:  $p < 0,0001$  *versus* tratamientos con Epo o EpoL. Elaboración propia.

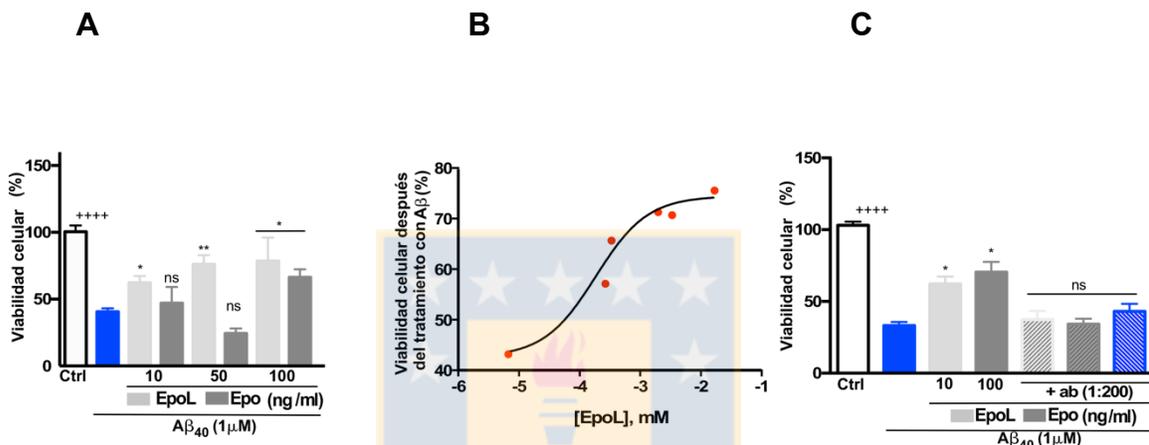
## 5 EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE EPO Y EPOL EN ESTRÉS MEDIADO POR A $\beta$ .

### 5.1 Determinación del efecto neuroprotector de Epo y EpoL en estrés crónico inducido por A $\beta$ <sub>40</sub>.

A continuación se evaluó si las variantes de la hormona tienen un efecto protector en modelos de otras enfermedades relacionadas con estrés oxidativo, como las enfermedades neurodegenerativas (Ojala & Sutinen 2017). Para esto, utilizamos el modelo neuronal *in vitro* de células PC12, que fueron tratadas con oligómeros del péptido A $\beta$ , obtenidos de acuerdo a un protocolo previamente establecido (Fuentealba *et al* 2011).

Las células se incubaron durante 24 hrs con A $\beta$ <sub>40</sub> 1  $\mu$ M, obteniendo un 40,60 % ( $\pm$ 2,57) de viabilidad celular (Figura 12). Para evaluar el efecto neuroprotector de Epo y EpoL, se hicieron co-incubaciones con oligómeros del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> 1  $\mu$ M, a concentraciones crecientes de la hormona (10, 50, 100 ng/mL) durante 24 hrs. Observamos que la variante EpoL muestra una diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular con respecto a A $\beta$ , a una concentración 10 veces menor (10ng/mL), que lo observado para la isoforma Epo (100ng/mL). Además, el efecto neuroprotector máximo de EpoL, se observa a 50 ng/mL donde se obtuvo un 76,08% ( $\pm$ 6,72) de viabilidad celular. Por otro lado, Epo tiene un efecto de protección a (100 ng/mL), que llegó hasta 66,27 % ( $\pm$ 6,12) de viabilidad celular (Figura 12 A). Al realizar una curva dosis/respuesta, con el porcentaje de sobrevivencia celular de los tratamientos con EpoL, observamos que la IC50 de EpoL

es de 50 ng/mL (Figura 12 B). Finalmente, al seguir el mismo tratamiento de estrés utilizado en A, y bloquear la unión al receptor, el efecto neuroprotector se pierde en ambas variantes (Figura 12 C).



**Figura 12 La variante EpoL es neuroprotectora en estrés inducido por tratamientos crónicos con Aβ<sub>40</sub>:**

(A) Ensayo de viabilidad celular en PC12 tratadas con oligómeros de Aβ<sub>40</sub> (1 μM) durante 24hr y Epo o EpoL a diferentes concentraciones. El porcentaje de respuesta en viabilidad fue evaluado mediante MTT. (B) Curva dosis/respuesta, de EpoL evaluada según el porcentaje de respuesta en viabilidad después del tratamiento con Aβ<sub>40</sub>. (C) Ensayo de viabilidad, usando un anticuerpo específico para EpoR (ab 1:200). Valores corresponden al promedio ±SEM, n=3 usando *One-way ANOVA* y test postanálisis de Dunns. \*:p< 0,05; \*\*:p<0,01 *versus* PC12 tratadas con Aβ<sub>40</sub>; +++++:p<0,0001 *versus* células control. Elaboración propia.

## 5.2 Evaluación de parámetros sinápticos en efecto neuroprotector de Epo y EpoL frente a estrés inducido por Aβ<sub>40</sub>.

En modelos *in vitro* utilizados para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como AD, hay variaciones en parámetros sinápticos como: flujo transiente de calcio intracelular, frecuencia total en los eventos sinápticos, variaciones de la proteína sináptica *synaptic vesicle protein 2 SV2* (Sepulveda *et al*

2014) . Es por esto que evaluamos las variaciones en los parámetros sinápticos de cultivos primarios neuronales de hipocampo de rata con tratamientos de A $\beta$  y co-incubaciones con Epo o EpoL a las concentraciones neuroprotectoras mencionadas en 5.1.-

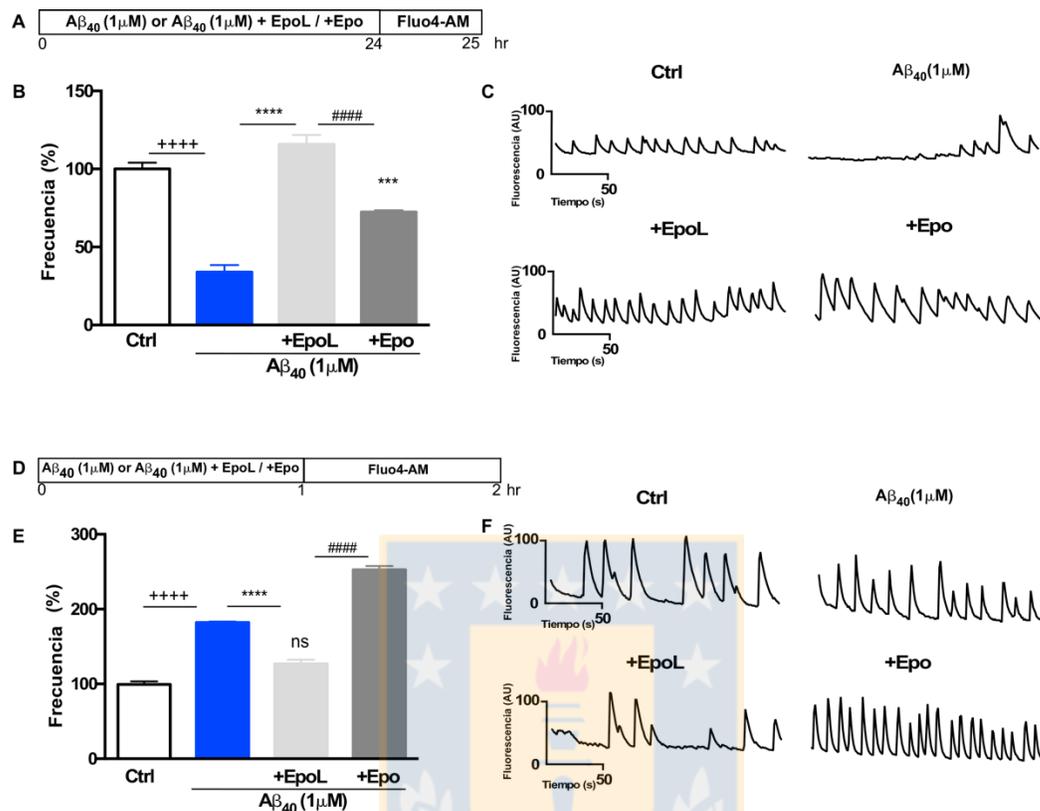
### **5.2.1 Evaluación del efecto de Epo y EpoL en flujo transiente de Ca<sup>+2</sup> intracelular.**

Los cultivos neuronales tratados de forma crónica con oligómeros de A $\beta$  disminuyen en la frecuencia de las flujo transiente de calcio (Sepulveda *et al* 2009, Sepulveda *et al* 2014). Considerando lo anterior, se realizó un tratamiento crónico (24 hrs) en cultivos primarios neuronales con oligómeros solubles del péptido A $\beta_{40}$  (1 $\mu$ M), co-incubando con Epo o EpoL a las concentraciones neuroprotectoras, y posteriormente se trataron las células con Flúo4-AM para evaluar los cambios intracelulares de calcio, de acuerdo al esquema de la figura 13 A. Se observó que el porcentaje de frecuencia de flujo transiente de calcio se reduce a un 33,96% ( $\pm$ 4,45), y en los tratamientos con EpoL éste porcentaje se mantuvo cercano al del control (115%  $\pm$ 5,98), a diferencia de lo observado con Epo donde hubo una disminución que llegó al 72,42% ( $\pm$ 1,2) (Figura 13 B,C).

El tratamiento con oligómeros de A $\beta_{40}$  en tratamientos agudos (1hr, A $\beta_{40}$  1 $\mu$ M) tiene un efecto de aumento en la frecuencia de flujo transiente de calcio, lo que finalmente agota el sistema de liberación sináptica, por lo que es un reflejo temprano de la toxicidad de A $\beta_{40}$  (Sepulveda *et al* 2009, Sepulveda *et al* 2014).

Se evaluó si el efecto preventivo y neuroprotector de las isoformas, mantiene la frecuencia de las flujo transiente de calcio en condiciones agudas de tratamiento con  $A\beta_{40}$ , de acuerdo al esquema mostrado en la figura 13 D. Observamos que  $A\beta$  aumenta el porcentaje de frecuencia a un 182,1% ( $\pm 1,35$ ), sin embargo el co-tratamiento con EpoL sólo aumenta hasta un 127% ( $\pm 5,36$ ), manteniendo una diferencia significativa con respecto a  $A\beta_{40}$ . Por otro lado, en los tratamientos realizados con Epo no hubo una disminución en la frecuencia, sino un aumento con una diferencia significativa con respecto al tratamiento con  $A\beta_{40}$  y con  $A\beta_{40} + \text{EpoL}$  (Figura 13 E, F).



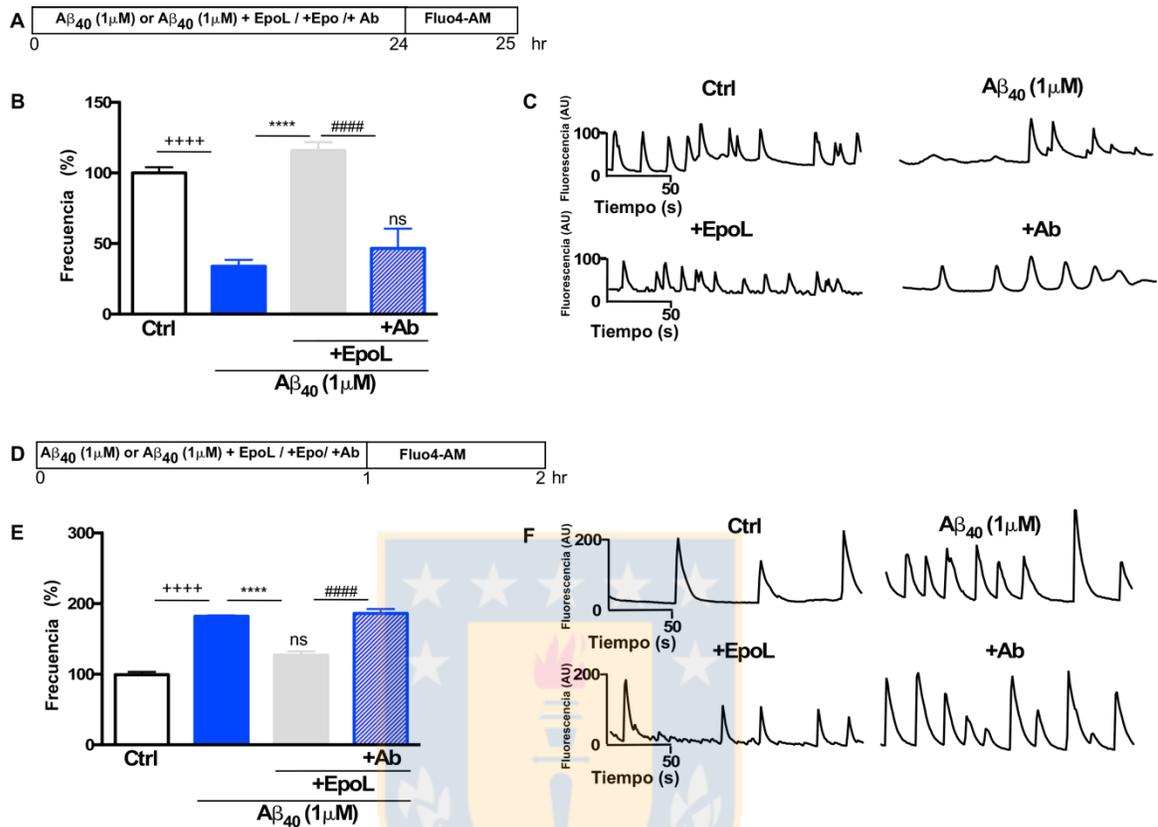


**Figura 13 Tratamientos con EpoL previenen la falla sináptica inducida por Aβ:**

(A,D) Cultivos neuronales de hipocampo fueron tratados durante 24 o 1 hr con oligómeros de Aβ y co-incubados con Epo y EpoL a concentraciones neuroprotectoras, como muestra el esquema. (B,E) Cuantificación del porcentaje de frecuencia de flujo transiente de calcio observadas usando Fluo4AM, en tratamientos de 24 hrs o 1 hr, respectivamente. (C,F) Trazos representativos de flujos transientes de calcio observadas durante 200s, usando 24 hrs o 1 hr de tratamiento, respectivamente. Valores corresponden al promedio ±SEM, n=3, usando *One-way* ANOVA y test postanálisis de Dunns. \*\*\*:p< 0,001; \*\*\*\*:p<0,0001 *versus* células tratadas con Aβ; ++++:p<0,0001 *versus* células control; ####:p<0,001; #####:p<0,0001 *versus* tratamientos con EpoL o Epo. Elaboración propia.

### **5.2.2 Evaluación de la participación de EpoR en el efecto preventivo de EpoL en flujo transiente de $Ca^{+2}$ intracelular.**

Debido a que se ha descrito la activación de EpoR activa canales de  $Ca^{+2}$  voltaje dependientes tipo L en neuronas, se evaluó la participación de EpoR en el efecto de EpoL sobre las flujo transiente de  $Ca^{+2}$  (Assandri *et al* 1999, Andoh *et al* 2011). Utilizando el anticuerpo anti-EpoR, se bloqueó la interacción de la variante EpoL con su receptor, de acuerdo a los esquemas indicados en la figura 14 (A,D). En tratamientos agudos y crónicos (24 hrs o 1 hr, respectivamente) hubo una pérdida del efecto preventivo que fue inducido por la co-incubación con EpoL. Para las incubaciones en condiciones crónicas, el porcentaje de frecuencia de flujo transiente fue de 46,5% ( $\pm 14,08$ ), similar al 33,96% ( $\pm 4,45$ ) observado para  $A\beta_{40}$ , evidenciando la pérdida del efecto preventivo (Figura 14 B,C). Esto fue consistente con lo observado en los tratamientos hechos en condiciones agudas, donde la incubación con el anticuerpo provocó no tuvo efecto significativo (186,1%; $\pm 6,16$ ) con respecto a lo registrado para  $A\beta_{40}$  (182,1%; $\pm 1,35$ ) (Figura 14 E,F).

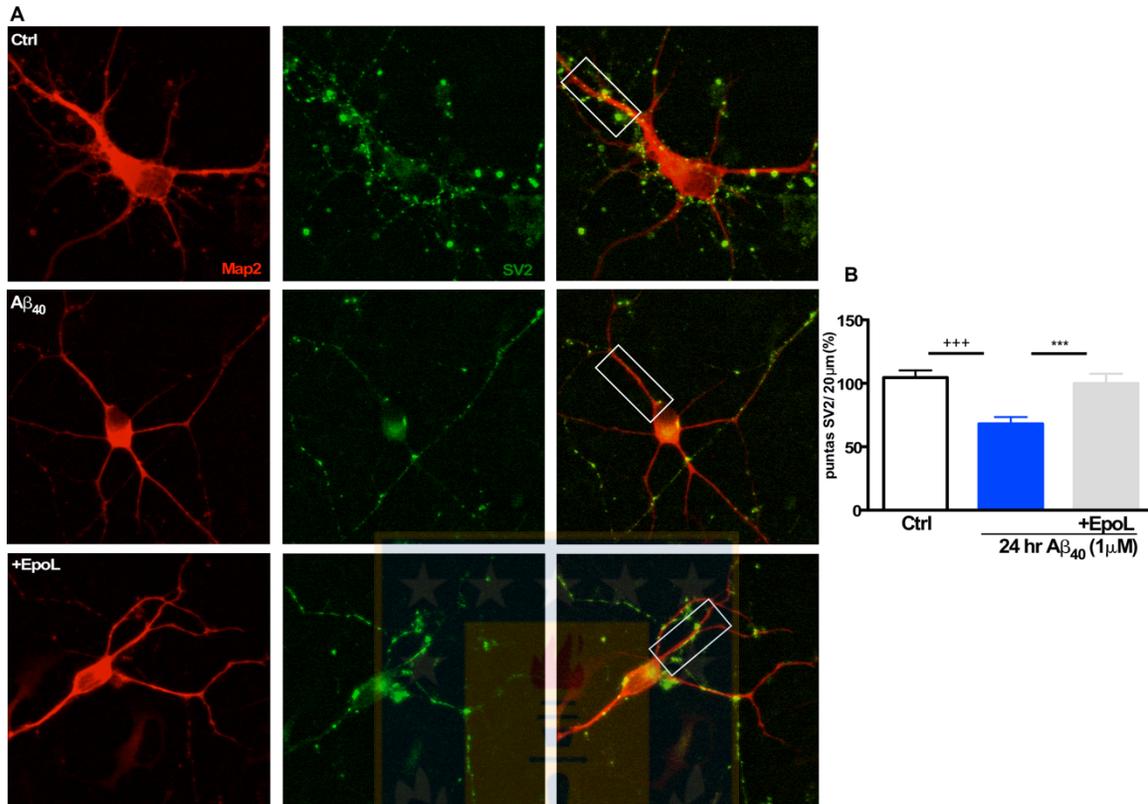


**Figura 14 El efecto preventivo de EpoL en las flujo transiente de  $Ca^{+2}$  intracelular está relacionado a la activación de EpoR:**

(A,D) Cultivos neuronales de hipocampo fueron tratados durante 24 o 1 hrs con oligómeros de  $A\beta$  y co-incubados con EpoL y un anticuerpo anti-EpoR, como muestra el esquema. (B,D) Cuantificación del porcentaje de frecuencia de flujo transiente de calcio, observado usando Fluo4 AM, durante 24 o 1 hrs de tratamiento con  $A\beta$ ,  $A\beta$ +EpoL,  $A\beta$ +EpoL+ab, respectivamente. (C,E) Trazos representativos de los flujos transientes de calcio observadas durante 200s, usando 24 hrs o 1 hr de tratamiento, respectivamente. Valores corresponden al promedio  $\pm$ SEM, n=3 usando *One-way* ANOVA y test postanálisis de Dunns. \*\*\*\*:p<0,0001 versus cultivo tratado con  $A\beta$ ; ++++:p<0,0001 versus células control; ####:p<0,0001 versus tratamientos con EpoL o EpoL+Ab. Elaboración propia.

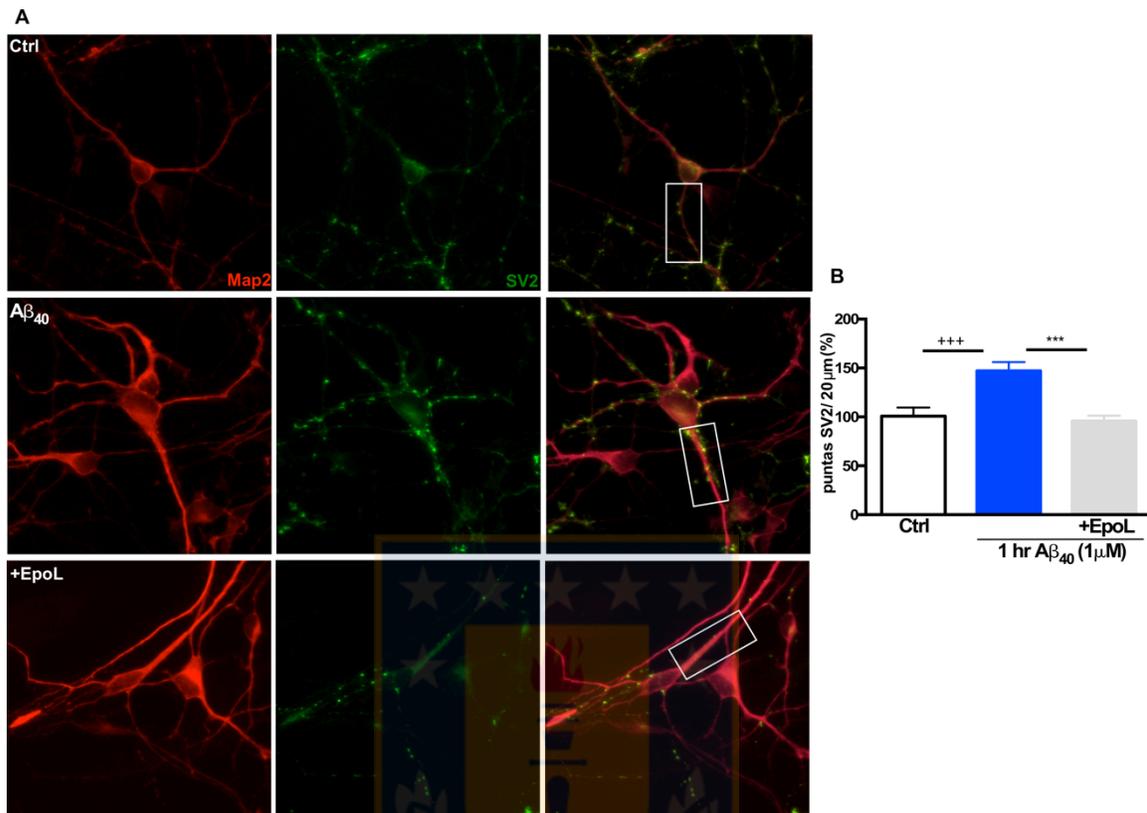
### **5.2.3 Evaluación del efecto de Epo y EpoL en la presencia sináptica de la proteína SV2.**

De acuerdo a lo previamente reportado y en concordancia con lo observado en las flujo transiente de calcio intracelular, el inmunomarcaje de la proteína pre-sináptica SV2 varían en los procesos primarios neuronales, cuando estos son estresados con oligómeros del péptido A $\beta$  (Parodi *et al* 2010, Ramirez *et al* 2014). Cuantificamos el inmunomarcaje de esta proteína pre-sináptica en las primeras 20  $\mu$ m de los procesos neuronales, en tratamientos con A $\beta$  y en A $\beta$ +EpoL a la concentración con función neuroprotectora y antes utilizada para evaluar parámetros sinápticos (10 ng/mL) y que previene la perdida de actividad sináptica. Al co-incubar durante 24 hrs A $\beta_{40}$  (1 $\mu$ M) (Figura 15) con la isoforma de baja glicosilación, EpoL, la evaluación de la inmunoreactividad cuantificada en imágenes confocales (Figura 15 A), como el porcentaje de SV2 cuantificado se mantuvo en 99,83% ( $\pm$ 7,76) sin diferencia significativa con respecto al control. Sin embargo, sí hubo diferencia con respecto al tratamiento con A $\beta$ , ya que el porcentaje se redujo hasta el 68,04% ( $\pm$ 5,34) (Figura 15 B). De forma similar, en 1 hr de co-incubación con A $\beta$ , EpoL tuvo un efecto preventivo en la variación de SV2. Como se observa en las imágenes confocales (Figura 16 A) hubo un aumento en el porcentaje de SV2 que llega hasta el 147% ( $\pm$ 9,06) en los tratamientos con A $\beta$ , sin embargo, en las co-incubaciones con EpoL, el porcentaje se mantuvo cercano al control sin tener diferencia significativa, con un 95% ( $\pm$ 5,5) (Figura 16 B).



**Figura 15 Efecto neuroprotector de EpoL en la variación de SV2 inducida por tratamientos crónicos de Aβ:**

(A) Imágenes confocales de cultivos neuronales de hipocampo tratados por 24 hrs con oligómeros de Aβ y con-incubados con EpoL a concentración neuroprotectora, para analizar Map2 y SV2. (B) Gráficos de la cuantificación de SV2 observado en procesos primarios neuronales (primeras 20 μm de cada neurona) de cada neurona a 24 hrs de co-incubación. Valores corresponden al promedio ±SEM, n=3 usando *One-way* ANOVA y test de Dunns para postanálisis. \*\*\*:p<0,001 *versus* cultivo neuronal tratado con Aβ; +++:p<0,001 *versus* células control. Elaboración propia.



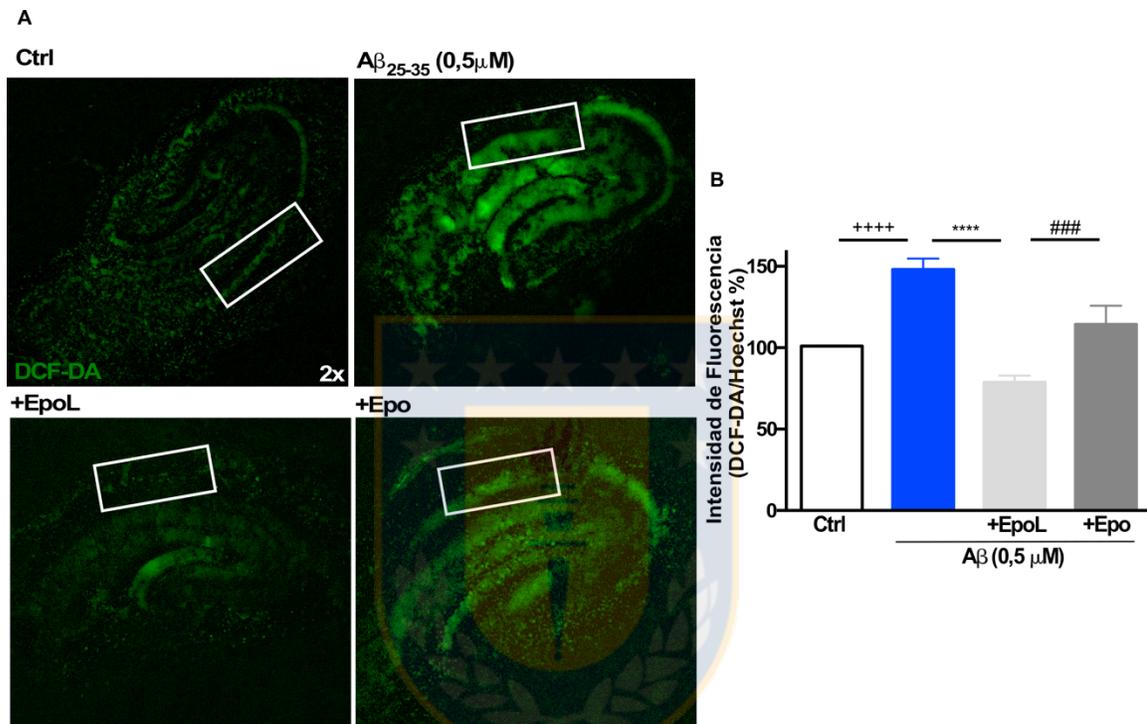
**Figura 16 Efecto neuroprotector de EpoL en la variación de SV2 por tratamientos agudos de A $\beta$ :**

(A) Imágenes confocales de cultivos neuronales de hipocampo tratados por 1 hr con oligómeros de A $\beta$  y con-incubados con EpoL a concentración neuroprotectora, para analizar Map2 y SV2. (B) Gráficos de la cuantificación de SV2 observadas en procesos primarios neuronales (primeras 20  $\mu$ m de cada neurona) de cada neurona a 1 hr de co-incubación. Valores corresponden al promedio  $\pm$ SEM, n=3 usando *One-way* ANOVA y test de Dunns para postanálisis. \*\*\*:p<0,001 *versus* cultivo neuronal tratado con A $\beta$ ; +++:p<0,001 *versus* células control. Elaboración propia.

## **6 Evaluación del efecto neuroprotector de Epo y EpoL en el estrés oxidativo inducido por A $\beta$ en cultivos organotípicos de hipocampo.**

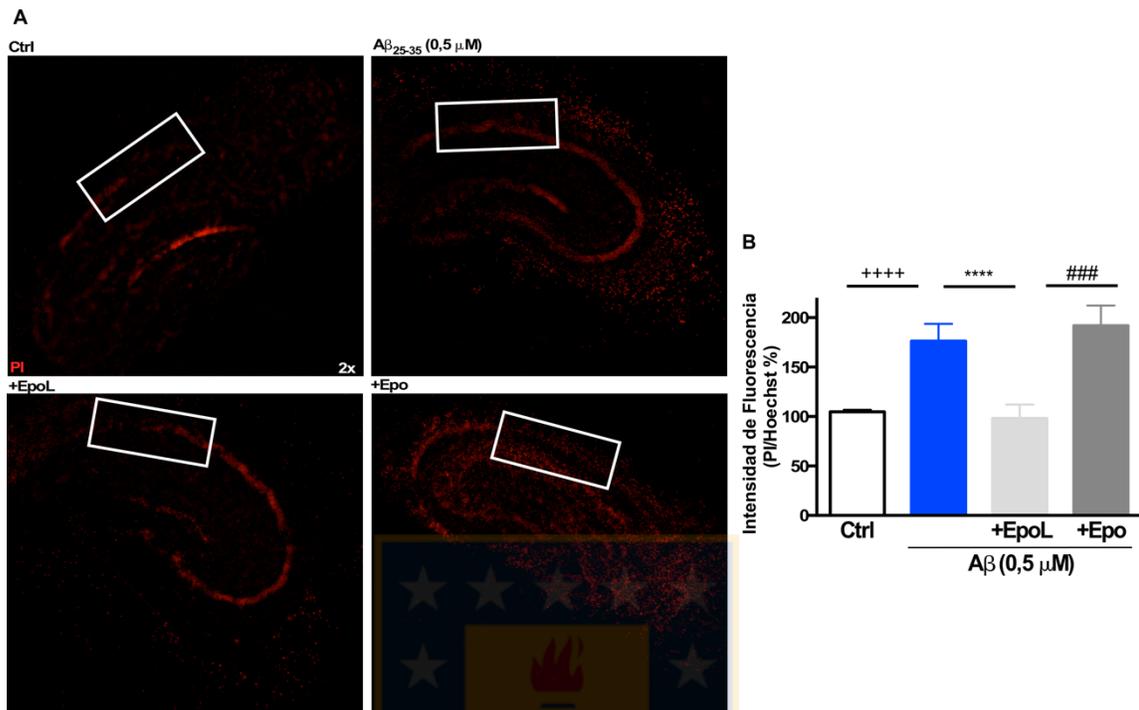
Para evaluar los efectos de tratamientos crónicos de A $\beta$  en el estrés oxidativo local, se utilizaron modelos *ex vivo* con cultivos organotípicos de hipocampo de rata, que fueron tratados con A $\beta$  durante cuatro días, de acuerdo al protocolo antes mencionado (Buendia *et al* 2016). Ya que previamente se ha demostrado que existe un aumento local de estrés oxidativo que coincide con un aumento en la muerte celular local (Egea *et al* 2015), evaluamos si, la co-incubación con Epo y EpoL disminuyó el aumento de ROS y la muerte celular, en ambos casos usamos concentraciones neuroprotectoras determinadas en los tratamientos *ex vivo* evaluados previamente, en rebanadas de hipocampo (EpoL y Epo 100 ng/mL) (Figura 17). El tratamiento con A $\beta$  indujo un aumento de ROS, evaluado por imágenes de fluorescencia, en la región de CA1 del hipocampo (Figura 17 A) de 148% ( $\pm$ 6,69), el cual fue prevenido por el tratamiento con EpoL, disminuyendo hasta un 78,7% ( $\pm$ 4,14). De forma similar, los tratamientos con Epo disminuyeron hasta un valor similar al control 114,4% ( $\pm$ 11,49) (Figura 17 B). Este resultado se correlacionó con lo que obtuvimos al analizar la muerte celular, usando PI (Figura 18). En las mismas condiciones de tratamiento, en imágenes de fluorescencia de los cultivos organotípicos (Figura 18 A) se observó un porcentaje de muerte de 176,3% ( $\pm$ 17,40), a diferencia de lo que se observó en los tratamientos con EpoL, ya que el porcentaje de muerte se mantuvo similar al control con un 97,9% ( $\pm$ 14,17). Por otro lado, los tratamientos con Epo no mostraron un efecto

citoprotector, ya que el porcentaje de muerte medido por PI, se mantuvo en un 191,9% ( $\pm 20,2$ ), similar al tratamiento con A $\beta$  (Figura 18 B).



**Figura 17 El tratamiento con EpoL disminuye el estrés oxidativo en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$ :**

(A) Imágenes de epifluorescencia de cultivos organotípicos de hipocampo tratados por 4 días con A $\beta_{25-35}$  (0,5 $\mu$ M) y co-incubado con EpoL o Epo a las concentraciones neuroprotectoras previamente determinadas (100ng/mL). (B) Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de DCF-DA/ Hoechst en la región CA1. Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM, n=5 usando *One-way* ANOVA y el test post-análisis de Tukey. \*\*\*\*:p<0,0001 *versus* cultivos tratados con A $\beta$ ; +++++:p<0,001 *versus* controles; ###:p<0,001 *versus* tratamiento con Epo. Elaboración propia.



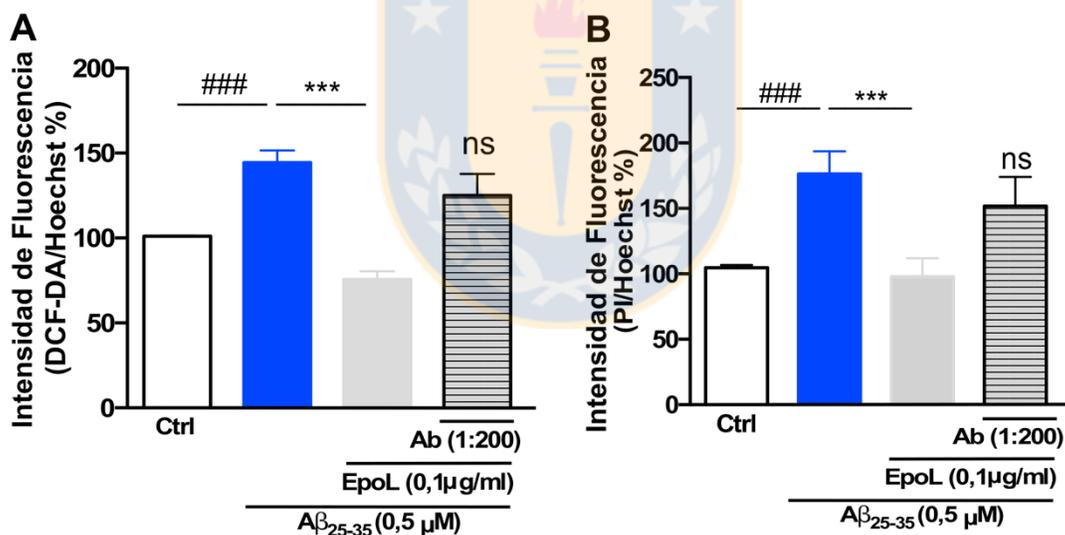
**Figura 18 El tratamientos con EpoL disminuye la muerte celular en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Aβ:**

(A) Imágenes de epifluorescencia de cultivos organotípicos de hipocampo tratados por 4 días con Aβ<sub>25-35</sub> (0,5μM) y co-incubado con EpoL o Epo a las concentraciones neuroprotectoras previamente determinadas (100 ng/mL). (B) Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de PI/ Hoechst en la región CA1. Valores corresponden al promedio ± SEM, n=5 usando *One-way* ANOVA y el test post-análisis de Tukey. \*\*\*\*:p<0,0001 *versus* cultivos tratados con Aβ; ++++:p<0,001 *versus* controles; ###:p<0,001 *versus* tratamiento con Epo. Elaboración propia.

### 6.1 Evaluación de las vías de activación implicadas en el efecto neuroprotector de EpoL en cultivos organotípicos tratados con Aβ.

Para caracterizar el mecanismo implicado en el efecto de EpoL en este modelo de cultivos organotípicos, evaluamos si los efectos observados en las figuras 17 y 18 estaban relacionados con la interacción de la hormona y el receptor. Por lo que repetimos el mismo esquema de incubaciones con Aβ, Aβ y EpoL, sumando la co-incubación con el anticuerpo anti-EpoR (Figura 19). De esto, se obtuvo que el

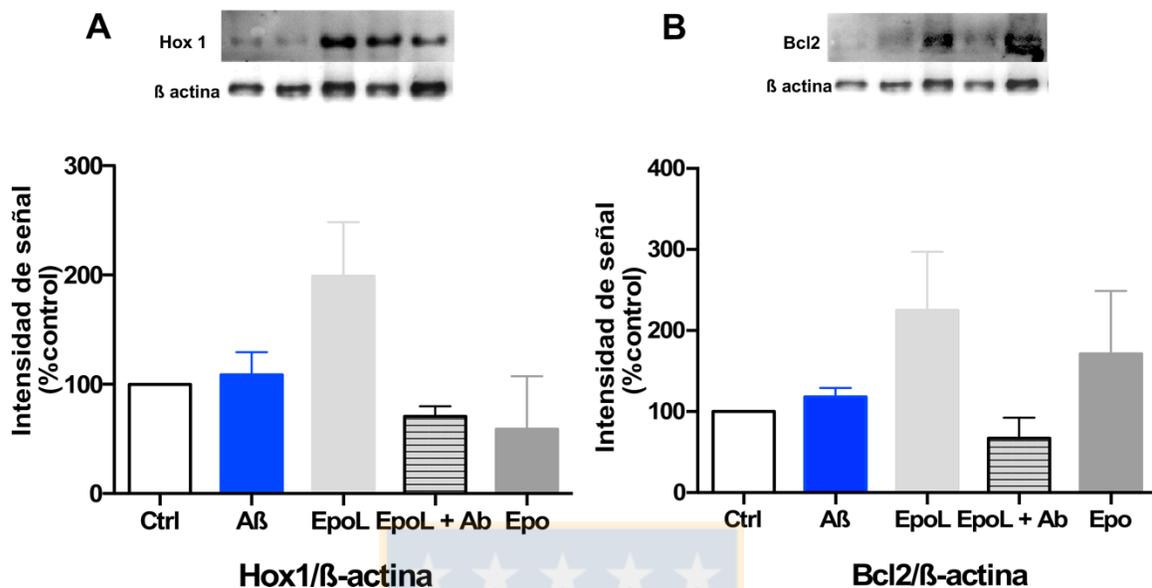
efecto de prevenir el aumento de ROS, y el de prevenir la muerte celular se perdieron al realizar los tratamientos con Ab (1:200). Al incubar con Ab y evaluar ROS, la intensidad de fluorescencia de DCF-DA/Hoescht se mantuvo superior al control, alcanzando un 125% ( $\pm 12,75$ ) sin una diferencia significativa con respecto a los tratamientos con A $\beta$  (145% $\pm 7$ ) (Figura 19 A). Al usar Ab, y cuantificar la señal de fluorescencia de PI/Hoescht, el porcentaje de muerte aumentó hasta el 151,8% ( $\pm 22,3$ ), a diferencia de lo observado para el tratamiento con la variante de baja glicosilación, EpoL, que mantuvo el porcentaje de PI/Hoescht cercano al 100%, de forma similar al control (98% $\pm 14$ ) (Figura 19 B).



**Figura 19 El efecto neuroprotector de EpoL en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con A $\beta$  depende de la interacción con EpoR:**

(A) Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de DCF-DA/ Hoechst en la región CA1 de Imágenes de epifluorescencia de cultivos organotípicos de hipocampo tratados por 4 días con A $\beta_{25-35}$  (0,5 $\mu$ M) y co-incubado con EpoL o EpoL+Ab (B) Cuantificación de la intensidad de señal fluorescente de PI/ Hoechst en la región CA1 en las mismas condiciones de A. Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM, n=7 usando *One-way* ANOVA y el test post-análisis de Tukey. \*\*\*:p<0,001 y “ns” versus cultivos tratados con A $\beta$ ; ####:p<0,001 versus controles. Elaboración propia.

Como hemos mencionado una de las vías implicadas en la neuroprotección de Epo y EpoL es la activación de la familia de genes Bcl-2, por lo tanto, evaluamos si en este modelo de tratamiento se observa una variación en los niveles proteicos de Bcl-2, mediante western blot. Además, en cultivos organotípicos que son tratados de forma crónica con A $\beta$  y tratados con agentes neuroprotectores, hay una inducción de la enzima Hemoxigenasa-1 (Hox-1), directamente relacionada con efectos antioxidantes y antiinflamatorios, provocando la disminución de ROS (Buendia *et al* 2015c). Por lo tanto, también se evaluó si la disminución de ROS inducida por EpoL, estaba relacionados con Hox-1 (Figura 20). De estos resultados, se obtuvo una tendencia a aumentar la expresión a nivel proteico sólo en los tratamientos con EpoL (Figura 20 A), y además hubo una tendencia a aumentar en la expresión de Bcl-2/ $\beta$ -actina en los cultivos tratados con EpoL, en comparación con los que fueron tratados con A $\beta$ . Por otro lado, éste efecto se bloqueó cuando la co-incubación fue realizada con el anti-EpoR, y de forma similar, en los tratamientos con Epo, no hubo tendencia a aumentar Bcl-2 (Figura 20 B).



**Figura 20 El efecto neuroprotector de EpoL en cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Aβ está relacionado con efecto antioxidante:**

(A) Imágenes representativas de western blot y cuantificación de la intensidad de señal de Hox1/βactina en lisados de cultivos organotípicos de hipocampo tratados por 4 días con Aβ<sub>25-35</sub> (0,5μM) y co-incubado con Epo, EpoL o EpoL+Ab (B) Imágenes representativas de western blot y cuantificación de la intensidad de señal de Bcl-2/β-actina en lisados de cultivos organotípicos de hipocampo tratados igual que en A. Valores corresponden al promedio ± SEM, n=3. Elaboración propia.

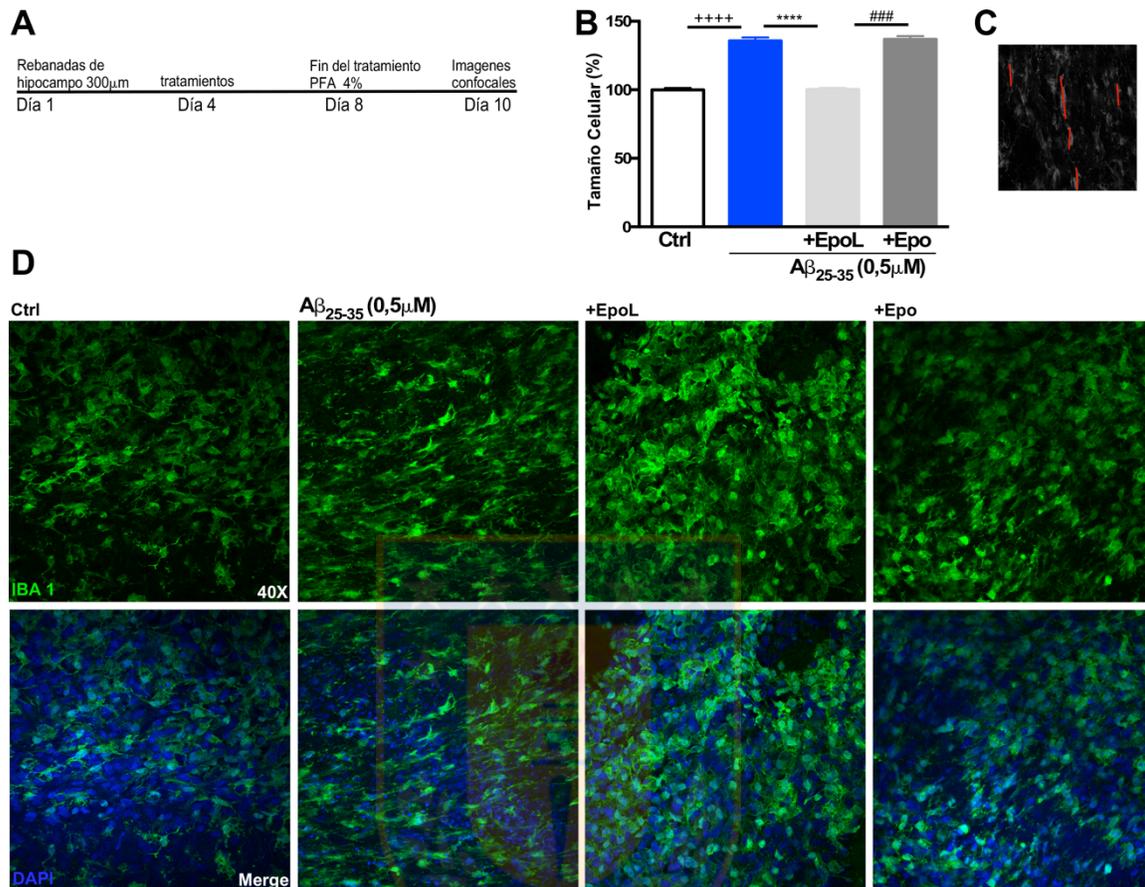
## 6.2 Evaluación del efecto neuroprotector de EpoL en microglia y astrocitos de cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Aβ.

### 6.2.1 Efecto neuroprotector de EpoL en microglia.

Otro efecto en el modelo de cultivos organotípicos de hipocampo tratados con Aβ, es la activación de la microglia, una respuesta a estrés crónico que induce una respuesta inflamatoria, característica de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (Parada *et al* 2015), por lo que se evaluó la activación de

microglia en nuestro modelo, de acuerdo a lo previamente reportados de otros agentes neuroprotectores y comparamos los efectos de EpoL (100ng/mL) (Figura 21 A) (Parada *et al* 2014, Buendia *et al* 2015b, Egea *et al* 2015). Al cuantificar (Figura 21 B,C) las imágenes confocales obtenidas, observamos que hubo variación en la morfología de la microglia en los tratamientos con A $\beta$ , indicando la activación de la microglia. Esta variación morfológica no se observó cuando realizamos co-incubaciones con EpoL (Figura 21 D).



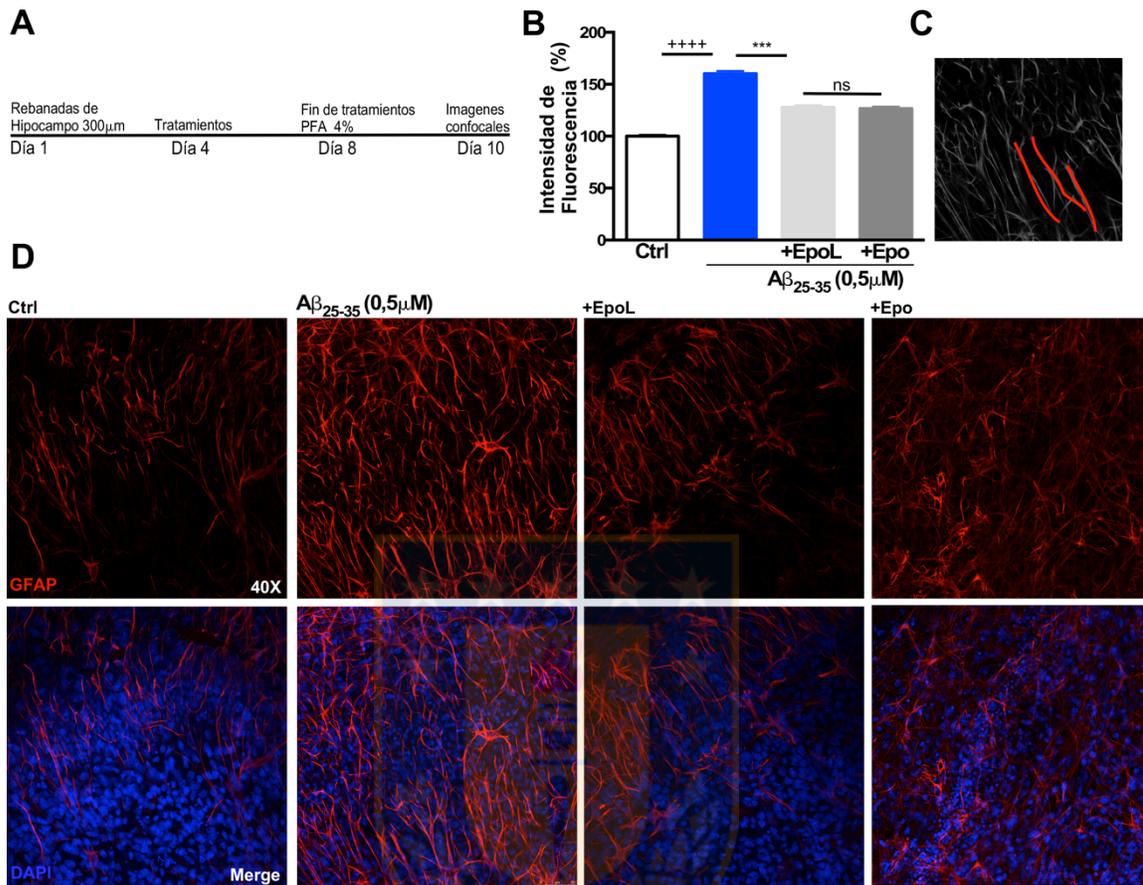


**Figura 21 EpoL previene la activación de la microglia inducida por tratamientos crónicos con A $\beta$ :**

(A) Esquema de tratamientos de cultivos organotípicos de hipocampo (B) Gráficos de cuantificación del tamaño celular en células positivas para IBA-1 (verde) en CA1, usando el software ImageJ/Neuron (C) Ejemplo de cuantificación del tamaño celular usando la función *Neuron* del software ImageJ. (D) Imágenes confocales de CA1 en Inmunofluorescencias para analizar la señal de IBA-1, de cultivos organotípicos de hipocampo tratados por 4 días con A $\beta_{25-35}$  (0,5µM) y co-incubados con Epo o EpoL a concentraciones neuroprotectoras. Valores corresponden al promedio  $\pm$ SEM, n=3 usando *One-way ANOVA* y test postanálisis de Dunns. \*\*\*\*:p<0,0001 versus cultivos tratados con A $\beta$ ; ++++:p<0,001 versus cultivo control; ###:p<0,001 versus tratamientos con Epo. Elaboración propia.

### **6.2.2 Efecto neuroprotector de EpoL en astrocitos.**

Otro indicador de estrés oxidativo e inflamatorio en el tejido tratado crónicamente con A $\beta$  es la astrogliosis, que se caracteriza por un aumento anormal en el número y morfología de los astrocitos, debido a la muerte de neuronas cercanas (Magaki *et al* 2017). Para evaluar los cambios morfológicos, realizamos inmunofluorescencias con GFAP, y determinamos las variaciones en la intensidad de señal, de acuerdo al esquema observado en la figura 22 A. Al cuantificar el porcentaje de aumento en la fluorescencia de los procesos GFAP positivos, observamos que los cultivos que fueron tratados con A $\beta$  aumentan un 60,2% ( $\pm 2,6$ ), en comparación con los que fueron co-incubados con EpoL, observamos que sólo hubo un incremento del 27,7% ( $\pm 2$ ), lo que es significativamente menor al inducido por tratamientos con A $\beta$ . De forma similar, las co-incubaciones con Epo, mostraron un incremento del 26,5% ( $\pm 1,8$ ), mostrando que ambas variantes tienen el mismo efecto en prevenir los signos de astrogliosis en co-incubaciones con A $\beta$  (Figura 22 B, C, D).



**Figura 22 EpoL previene los signos de astrogliosis inducidos por tratamientos crónicos con A $\beta$ :**

(A) Esquema de tratamientos de cultivos organotípicos de hipocampo (B) Gráficos de cuantificación de la intensidad de señal de GFAP, como marcador de astrogliosis (rojo) en CA1, usando el software ImageJ/Neuron (C) Ejemplo de cuantificación de la intensidad de señal en los procesos primarios, usando la función *Neuron* del software ImageJ. (D) Imágenes confocales de CA1 en Inmunofluorescencias para analizar la señal de GFAP, de cultivos organotípicos de hipocampo tratados por 4 días con A $\beta_{25-35}$  (0,5 $\mu$ M) y co-incubados con Epo o EpoL a concentraciones neuroprotectoras. Valores corresponden al promedio  $\pm$ SEM, n=3 usando *One-way ANOVA* y test postanálisis de Dunns. \*\*\*:p<0,001 *versus* cultivos tratados con A $\beta$ ; ++++:p<0,001 *versus* cultivo control; ####:p<0,001 *versus* tratamientos con Epo. Elaboración propia.

## VI. DISCUSIÓN

El método de producción de eritropoyetina usado en este trabajo, nos entrega una nueva variante de Epo con un patrón de glicosilación diferente al de Epo circulante en plasma y que resultó mayoritariamente en estructuras neutras, bi-antenarias y asialiladas (EpoL). Estas características generan una nueva variante de Epo con una actividad hematopoyética reducida o nula, tal como ha sido previamente descrito y confirmado en este trabajo (Toledo *et al* 2006, Montesino *et al* 2008). Según lo que se ha descrito previamente, estas características tienen relación directa con la vida media de la glicoproteína (Jelkmann 2002, Jelkmann 2008, Jiang *et al* 2014). Las características estructurales de Epo hematopoyética, con un patrón de glicosilación tetra-antenario, fucosilado y tetra- sialidado, incrementan su tamaño molecular, disminuyendo la filtración glomerular y previniendo su reconocimiento por los transportadores de pentosas presentes en el hígado, explicando así la influencia de las glicosilaciones en la vida media en circulación de Epo (Girard *et al* 2012, Salgado *et al* 2015). Como se ha mencionado preliminarmente, una de las desventajas del uso de la Epo como tratamiento preventivo para enfermedades asociadas al SNC, es su rol hematopoyético. Esto se debe a que aumentar el riesgo de daño en el tejido al incrementar el influjo de sangre al cerebro. Considerando esta problemática, se han desarrollado diferentes variantes de la Epo, que aumenten su afinidad al receptor, sin potenciar su actividad hematopoyética, manteniendo su efecto neuroprotector (Brines *et al.* 2005; Pankratova *et al.* 2010). Se han sintetizado isoformas de eritropoyetina que

no tengan actividad hematopoyética, removiendo los ácidos siálicos de la molécula. Epo asialilada tiene mayor afinidad por EpoR que Epo y tiene un tamaño molecular similar a la que se produce en el SNC (Masuda et al. 1999). Otra modificación que se ha realizado para disminuir la función hematopoyética de Epo, es la carbamilación de los residuos lisina, alterando tanto la conformación como la función de la hormona, ya que todas las lisinas son transformadas hasta homocitrulina, obteniendo una variante de Epo sin efecto hematopoyético, pero que mantiene su efecto neuroprotector *in vitro*. La desventaja de esta variante es su baja afinidad por el receptor (Leist et al. 2004). Además, se han sintetizado péptidos específicos para interactuar con la zona de unión de Epo a su receptor, activando sólo su función citoprotectora, lo que ha resultado con la desventaja de una vida media corta de aproximadamente 4 min (Brines et al. 2008). Éstos péptidos han sido diseñados, obteniéndose una mejor interacción con el receptor y una vida media mayor, debido a una disociación lenta del EpoR (Pankratova et al. 2010).

Sin embargo, la principal desventaja del uso de moléculas de este tipo, es que su obtención y procesamiento se realiza a través de procesos químicos especializados y complejos, lo que representa una desventaja biológica y económica.

Aún considerando esta problemática, el uso clínico de la hormona es necesario porque la deficiencia de Epo en el organismo provoca anemia severa (Maiese 2016a) como lo observado en pacientes con deficiencia renal crónica o fallos

renales asociados a traumas, tratamientos farmacológicos intensivos (pacientes con VIH, o quimioterapia) o en pacientes con transplantes de riñón, (ya que la producción de la hormona ocurre en el riñón (Maiese 2016a)). En todos estos casos es esencial el suministro externo de la hormona, es por esto, que Epo fue el primer factor de crecimiento hematopoyético en ser clonado y actualmente es uno de los fármacos aprobados para este tratamiento, por la *Food and Drugs Administration* (Ponce *et al* 2013, Jiang *et al* 2014, Maiese 2016a).

Considerando estos elementos y la relación de su actividad hematopoyética con las modificaciones en el patrón de glicosilación, esperábamos que la nueva variante EpoL, con una menor carga de ácido siálico terminal, tuviera una menor vida media, lo que podría explicar la disminución observada en la actividad hematopoyética (Figura 5). A pesar de esto, ambas moléculas, Epo y EpoL, interactúan con EpoR y activan la vía de señalización JAK/STAT, induciendo una sobreexpresión de genes antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (Figura 6), de forma similar a lo previamente reportado para la Epo hematopoyética circulante (Ma *et al* 2014). Así, EpoL demuestra un potencial como agente neuroprotector, de la misma forma que se ha reportado previamente para Epo recombinante humana, producida en células de ovario de hámster chino y que es hematopoyéticamente activa (Shen *et al* 2010, Javadi *et al* 2012, Jia *et al* 2014, Ma *et al* 2014).

Sin embargo, a pesar de activar las mismas vías de señalización, nuestros resultados confirman que EpoL tiene un efecto neuroprotector más potente que Epo contra el estrés oxidativo inducido por FCCP al comparar ambas isoformas a

igual concentración (10 ng/mL), (Figura 6). Además, este efecto neuroprotector fue observado en tiempos de incubación más cortos que los necesarios para que Epo tenga efecto citoprotector (Figura 7). Este efecto de EpoL con respecto a Epo, coincide con lo que se ha reportado en la diferencia de la potencia del efecto neuroprotector de Epo *versus* Epo producida en cerebro (con bajo nivel de glicosilación). Experimentos *in vitro* que demuestran que ambas tienen efecto anti-apoptótico, pero la variante con menor nivel de glicosilación muestra una potencia 10 veces mayor que Epo normal (Masuda et al. 1999).

Por otro lado, este efecto de EpoL también está directamente relacionado con la sobreexpresión de genes antiapoptóticos de la familia Bcl-2, ya que observamos que al mismo tiempo y concentración en que observamos actividad neuroprotectora también hubo un aumento significativo en la expresión de Bcl-2 (Figura 7 B). La activación de esta vía de señalización fue previamente descrita para la Epo nativa, lo que se correlaciona con nuestros datos, donde observamos que en tratamientos con Epo de 3 hrs también se activa Bcl-2 (Miljus et al 2014, Miljus et al 2017).

Sin embargo, no detectamos un efecto mitogénico, lo que sugiere que EpoL, a diferencia de Epo hematopoyética, no activa las vías de señalización que lleven a una respuesta proliferativa (Cho et al 2012, Chan et al 2017).

Adicionalmente, los tratamientos con peróxido de hidrógeno han sido establecidos como un modelo *in vitro* de estrés oxidativo (Gulden et al 2010). Usando este tratamiento, demostramos que EpoL induce un efecto neuroprotector 10 veces

más potente que Epo en células PC-12 (Figura 8 A), ya que protege de la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la concentración de 6 ng/mL. Además, este efecto fue bloqueado al usar un inhibidor de la activación EpoR (AG-490) (Figura 8 B), lo que indica que esta nueva variante también ejerce su efecto a través de la unión al receptor, tal como lo hace Epo y otros agentes neuroprotectores, según lo previamente reportado (Ma *et al* 2014, Buendia *et al* 2015b).

Considerando las diferencias en las concentraciones necesarias entre ambas variantes y los tiempos de incubación necesarios para obtener un efecto neuroprotector de EpoL, decidimos analizar en detalle las probabilidades de interacción de EpoL con EpoR y el receptor no hematopoyético expresado en SNC mediante modelación *in silico*, de forma de simular lo observado y previamente reportado para la variante producida en cerebro. En ese objetivo identificamos las regiones de interacción entre ambas variantes y ambos receptores (Figura 9). Los residuos de interacción reportados para Epo/EpoR son conservados casi en su totalidad para los modelos de EpoL/EpoR, lo que corrobora nuestros resultados *in vitro*, relacionados con la pérdida del efecto neuroprotector al bloquear la interacción del receptor con su ligando y al bloquear el primer paso de activación de EpoR. Además, los residuos de EpoL que interactúan con el receptor no hematopoyético son similares a los que interactúan con EpoR, confirmando la posibilidad de que el efecto neuroprotector de EpoL está mediado por el receptor expresado en SNC. En detalle podemos observar que los residuos más relevantes de interacción reportados para Epo y su receptor, se encuentran entre los residuos

100 y 115, lo que de acuerdo a nuestro análisis no reporta cambios entre ambas variantes (Figura 9 B). Un análisis más detallado de los complejos revela que ambos receptores (nonHem-EpoR y EpoR) interactúan establemente con Epo y EpoL generando complejos con energía total y de solvatación similares (Figura 9 C y D). Tomando en conjunto estos resultados, no podemos explicar las diferencias observadas en la concentración necesaria para el efecto neuroprotector entre EpoL y Epo, ya que los residuos analizados aportan de forma similar a la formación de complejos, según esta metodología. Sin embargo, cabe destacar que el receptor de la hormona tiene sitios potenciales de N-glicosilación, los cuales no fueron incorporados en el modelaje, por lo que sugerimos que eventualmente pueda existir una diferencia entre los residuos de interacción que explique las diferencias observadas en potencia, estudio que señalamos como relevante en las proyecciones de este trabajo. Por otro lado, el receptor no hematopoyético también interacciona con Epo de baja glicosilación y de acuerdo a la modelación *in silico*, esto podría presentar un mecanismo de activación similar al reportado para el receptor clásico expresado en tejido hematopoyético, confirmando nuestros datos *in vitro* (Heir *et al* 2016).

Considerando la evidencia de la interacción de EpoL con el receptor expresado en SNC y los resultados de neuroprotección *in vitro*, usamos rebanadas de hipocampo de rata como un modelo *ex vivo* de SNC y evaluamos la actividad neuroprotectora de Epo y EpoL en un modelo de isquemia inducido por privación de oxígeno y glucosa (Parada *et al* 2014, Ding *et al* 2016). Bajo estas

condiciones, simulando un proceso de isquemia cerebral, EpoL administrada como tratamiento post-OGD, muestra un efecto neuroprotector más potente que Epo, ya que nuevamente observamos que tiene efecto protector a concentraciones 10 veces más baja (100ng/mL) (Figura 10 A). Además, cuando las rebanadas de hipocampo fueron tratadas con un anticuerpo anti-EpoR, el efecto citoprotector observado para EpoL disminuyó significativamente, de forma similar a lo ocurrido al bloquear la activación de JAK/STAT (Figura 10 B). Por esto, sugerimos que el efecto neuroprotector de ambas variantes Epo y EpoL en estrés oxidativo, está directamente relacionado a la activación de EpoR, a través de la fosforilación de JAK/STAT, la sobreexpresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2 y la disminución de ROS inducida por OGD. Otros autores han descrito efectos similares con respecto a la activación de familia de genes que previenen apoptosis y la disminución del estrés oxidativo, los que han sido inducidos por compuestos neuroprotectores como Curcumina o Melatonina, que activan genes relacionados a la supervivencia celular como por ejemplo el factor nuclear (erythroid-derived 2)-like 2, también llamado Nrf2 (Egea *et al* 2015, Hernandez *et al* 2017). Éste es un miembro del grupo de factores de transcripción que activa los genes pertenecientes a ARE (Antioxidant Response Element) y que regulan la respuesta celular al estrés oxidativo, induciendo la activación de genes de fase II como Hemoxigenasa-1, que está relacionada con la mantención de la homeostasis redox y la supervivencia celular (Buendia *et al* 2015a, Hornedo-Ortega *et al* 2018). Nuestros resultados indican un aumento en la expresión de Bcl-2 y una

disminución de ROS y muerte celular inducido por EpoL frente a estrés oxidativo (Figura 11), sugiriendo que esta variante de la hormona podría activar el mismo mecanismo de acción, a través de Nrf2 y de otros genes encargados de la supervivencia celular, para prevenir las señales apoptóticas y promover la disminución de la inflamación (Parada *et al* 2015, Buendia *et al* 2016). En este sentido, los datos de cultivos organotípicos de hipocampo tratados crónicamente con A $\beta$  también muestran una disminución del estrés oxidativo y muerte celular inducidos por la incubación con A $\beta$  (Figura 17 y 18, respectivamente). En estos datos es interesante destacar también que los tratamientos con EpoL previenen el aumento de estrés oxidativo inducido de forma basal por el modelo utilizado, ya que vemos una disminución significativa de DCF-DA con respecto a la condición control. Este efecto se correlaciona con lo observado en experimentos de western blot de cultivos organotípicos de hipocampo, que muestran una tendencia a aumentar la expresión de Hox-1, en concordancia con un aumento de Bcl-2, sugiriendo que EpoL también promueve una disminución de ROS y de la inflamación frente a este tipo de estrés (Figura 20), de forma similar a lo reportado por agentes neuroprotectores que estimulan a Nrf2.

Nuestros resultados sugieren que no existe una afinidad diferente entre EpoL y el receptor no hematopoyético, apoyando la idea de que los efectos mediados por esta variante están directamente relacionados a la unión y activación de vías de señalización en tejido neuronal. Es por esto que también evaluamos algunos parámetros de actividad sináptica en cultivos neuronales que varían con la

activación de EpoR (Assandri *et al* 1999, Andoh *et al* 2011). Por ejemplo, las flujo transiente de  $Ca^{+2}$  son un reflejo indirecto de la actividad sináptica, ya que corresponden a la entrada del ión  $Ca^{+2}$  al medio intracelular en el componente post-sináptico mediante la apertura de canales activados por ligando. Por lo tanto, son dependientes de la liberación del neurotransmisor al medio extracelular y en consecuencia, dependientes de la funcionalidad del componente pre-sináptico, siendo un reflejo indirecto de la comunicación sináptica . Con respecto a esto, se ha reportado que los agregados de A $\beta$ , inducen cambios en los niveles de calcio intracelular, provocando un aumento que finalmente contribuye a la toxicidad y muerte neuronal (Sepulveda *et al* 2009, Sepulveda *et al* 2014). Sin embargo, los tratamientos con Epo y EpoL previenen este efecto de forma dependiente de la activación de EpoR, sugiriendo que la activación del receptor tiene una consecuencia en el potencial de membrana, lo que pudiera explicar la activación de canales de calcio que finalmente influyen en la frecuencia de flujo transiente de calcio (Figuras 13 y 14). Es probable que este efecto en el potencial de membrana, además tenga una repercusión en la liberación de vesículas sinápticas, parámetro que evaluamos mediante la cuantificación de SV2, donde observamos una concordancia del efecto neuroprotector de EpoL tanto en tratamientos crónicos como agudos de A $\beta$ , lo que podría relacionarse con efectos neuroprotectores descritos para Epo, que señalan una disminución en la liberación de glutamato (Figuras 15 y 16) (Gu *et al* 2014, Yu *et al* 2016) Además, es probable que por la composición aminoacídica de eritropoyetina pudiera alterar la

interacción de oligómeros de A $\beta$  con la membrana, impidiendo la formación del poro que hace aumentar el Ca<sup>+2</sup> intracelular, similar a los reportado para otros agentes neuroprotectores probados en tratamientos *in vitro* con A $\beta$  (Peters *et al* 2013).

Finalmente, en estos mismos tratamientos, evaluamos parámetros de activación de la glía, característicos de procesos inflamatorios crónicos, como lo observado en enfermedades neurodegenerativas y también observados en enfermedades con un aumento de ROS local, como durante el infarto cerebrovascular (Iwai *et al* 2010, Peters *et al* 2013, Zurita *et al* 2013, Pasqualetti *et al* 2015). En estos estudios evaluamos la astrogliosis mediante GFAP y de la activación de Iba-1, ambos parámetros se vieron alterados en tratamientos con A $\beta$  y revertidos con co-incubaciones con EpoL de forma similar a lo observado para efectos descritos con Epo y lo que se ha reportado por el uso de agentes neuroprotectores inductores de Nrf2 y antiapoptóticos (Figuras 21 y 22, respectivamente) (Egea *et al* 2015, Wang *et al* 2015, Nekoui & Blaise 2017).

Por último, al evaluar estas variaciones morfológicas, podemos señalar que ambas variantes de la hormona tienen efectos antiapoptóticos, previenen el estrés oxidativo, y también contribuyen a disminuir los efectos de inflamación crónica relacionados con enfermedades neurodegenerativas, utilizando un mecanismo de activación por activación de EpoR.

Tomando en consideración todos los resultados expuestos y comentados anteriormente, podemos resumir que:

- EpoL no tiene actividad hematopoyética significativa, con respecto a Epo.
- EpoL y Epo interactúan con EpoR (y NonHemEpoR), utilizando residuos aminoacídicos similares y formando complejos estables con energía similar.
- EpoL tiene un efecto neuroprotector, que depende de la activación de EpoR (o NonHemEpoR en el caso del SNC) vía JAK/STAT, previniendo la apoptosis, al incrementar la expresión de genes de la familia Bcl-2, de forma similar a lo reportado para Epo.
- EpoL tiene un efecto protector en parámetros sinápticos, en modelos neuronales *in vitro* y *ex vivo*, además previene el aumento de estrés oxidativo y disminuye los marcadores inflamatorios en modelos neuronales *ex vivo*.
- La concentración necesaria para que EpoL tenga efecto neuroprotector en modelos *in vitro* y *ex vivo* es 10 veces menor que la necesaria para Epo.

## VII. CONCLUSIÓN

La variante EpoL, con un patrón de glicosilación bi-antenario y asialilado, no altera el hematocrito y se une al receptor presente en el Sistema Nervioso Central, activando vías de señalización que tienen un efecto neuroprotector tanto a nivel celular como sináptico, a concentraciones diez veces menores que Epo, por lo que podría utilizarse EpoL como un biofármaco para el estudio y tratamiento de enfermedades relacionadas al SNC y estrés oxidativo, como el infarto cerebrovascular o enfermedades neurodegenerativas.



## REFERENCIAS:

- Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, Medrihan L, Gertler C, *et al.* 2008. Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC biology* 6: 37
- Adlung L, Kar S, Wagner MC, She B, Chakraborty S, *et al.* 2017. Protein abundance of AKT and ERK pathway components governs cell type-specific regulation of proliferation. *Molecular systems biology* 13: 904
- Andoh T, Echigo N, Kamiya Y, Hayashi M, Kudoh I, Goto T. 2011. Effects of erythropoietin on intracellular calcium concentration of rat primary cortical neurons. *Brain research* 1387: 8-18
- Armand-Ugon M, Aso E, Moreno J, Riera-Codina M, Sanchez A, *et al.* 2015. Memory Improvement in the AbetaPP/PS1 Mouse Model of Familial Alzheimer's Disease Induced by Carbamylated-Erythropoietin is Accompanied by Modulation of Synaptic Genes. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 45: 407-21
- Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, *et al.* 1999. Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. *The Journal of physiology* 516 ( Pt 2): 343-52
- Assaraf MI, Diaz Z, Liberman A, Miller WH, Jr., Arvanitakis Z, *et al.* 2007. Brain erythropoietin receptor expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 66: 389-98
- Banks DD. 2011. The effect of glycosylation on the folding kinetics of erythropoietin. *Journal of molecular biology* 412: 536-50
- Batmunkh C, Krajewski J, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. 2006. Erythropoietin production: Molecular mechanisms of the antagonistic actions of cyclic adenosine monophosphate and interleukin-1. *FEBS letters* 580: 3153-60
- Brines M, Cerami A. 2005. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience* 6: 484-94
- Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, *et al.* 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14907-12
- Buendia I, Egea J, Parada E, Navarro E, Leon R, *et al.* 2015a. The melatonin-N,N-dibenzyl(N-methyl)amine hybrid ITH91/IQM157 affords neuroprotection in an in vitro Alzheimer's model via hemo-oxygenase-1 induction. *ACS chemical neuroscience* 6: 288-96
- Buendia I, Gomez-Rangel V, Gonzalez-Lafuente L, Parada E, Leon R, *et al.* 2015b. Neuroprotective mechanism of the novel melatonin derivative Neu-P11 in brain ischemia related models. *Neuropharmacology* 99: 187-95
- Buendia I, Navarro E, Michalska P, Gameiro I, Egea J, *et al.* 2015c. New melatonin-cinnamate hybrids as multi-target drugs for neurodegenerative

- diseases: Nrf2-induction, antioxidant effect and neuroprotection. *Future medicinal chemistry* 7: 1961-9
- Buendia I, Parada E, Navarro E, Leon R, Negredo P, *et al.* 2016. Subthreshold Concentrations of Melatonin and Galantamine Improves Pathological AD-Hallmarks in Hippocampal Organotypic Cultures. *Molecular neurobiology* 53: 3338-48
- Bunn HF. 2013. Erythropoietin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3: a011619
- Castaneda-Arellano R, Feria-Velasco AI, Rivera-Cervantes MC. 2014. Activity increase in EpoR and Epo expression by intranasal recombinant human erythropoietin (rhEpo) administration in ischemic hippocampi of adult rats. *Neuroscience letters* 583: 16-20
- Castillo C, Zaror, S, Gonzalez, M, Hidalgo, A, Burgos, C. F,*et al.* 2018. Neuroprotective effect of a new variant of Epo nonhematopoietic against oxidative stress. *Redox Biology* 14: 285-294
- Chan KK, Matchett KB, Coulter JA, Yuen HF, McCrudden CM, *et al.* 2017. Erythropoietin drives breast cancer progression by activation of its receptor EPOR. *Oncotarget* 8: 38251-63
- Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. 2011. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical pharmacology* 82: 1291-303
- Cheetham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, *et al.* 1998. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nature structural biology* 5: 861-6
- Chen J, Yang Z, Zhang X. 2015. Carbamylated Erythropoietin: A Prospective Drug Candidate for Neuroprotection. *Biochemistry insights* 8: 25-9
- Cho YK, Kim G, Park S, Sim JH, Won YJ, *et al.* 2012. Erythropoietin promotes oligodendrogenesis and myelin repair following lysolecithin-induced injury in spinal cord slice culture. *Biochemical and biophysical research communications* 417: 753-9
- Chong ZZ, Li F, Maiese K. 2005. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Current neurovascular research* 2: 387-99
- Chong ZZ, Shang YC, Mu Y, Cui S, Yao Q, Maiese K. 2013. Targeting erythropoietin for chronic neurodegenerative diseases. *Expert opinion on therapeutic targets* 17: 707-20
- Ding J, Wang J, Li QY, Yu JZ, Ma CG, *et al.* 2016. Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT Pathway of Carbamylated Erythropoietin in Hypoxic Neurons. *Molecular neurobiology* 10.1007/s12035-016-0022-0
- Egea J, Buendia I, Parada E, Navarro E, Rada P, *et al.* 2015. Melatonin-sulforaphane hybrid ITH12674 induces neuroprotection in oxidative stress conditions by a 'drug-prodrug' mechanism of action. *British journal of pharmacology* 172: 1807-21

- Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, *et al.* 2004. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metabolic brain disease* 19: 195-206
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, *et al.* 2002. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular medicine* 8: 495-505
- Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, *et al.* 2007. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Molecular psychiatry* 12: 206-20
- Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, *et al.* 2009. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 40: e647-56
- Erbas O, Cinar BP, Solmaz V, Cavusoglu T, Ates U. 2015. The neuroprotective effect of erythropoietin on experimental Parkinson model in rats. *Neuropeptides* 49: 1-5
- Esmaeili Tazangi P, Moosavi SM, Shabani M, Haghani M. 2015. Erythropoietin improves synaptic plasticity and memory deficits by decrease of the neurotransmitter release probability in the rat model of Alzheimer's disease. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 130: 15-21
- Fisher JW. 2003. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Experimental biology and medicine* 228: 1-14
- Fuentealba J, Dibarrart AJ, Fuentes-Fuentes MC, Saez-Orellana F, Quinones K, *et al.* 2011. Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid-beta aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. *Journal of neuroscience research* 89: 1499-508
- Fukuda MN, Sasaki H, Lopez L, Fukuda M. 1989. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood* 73: 84-9
- Gan Y, Xing J, Jing Z, Stetler RA, Zhang F, *et al.* 2012. Mutant erythropoietin without erythropoietic activity is neuroprotective against ischemic brain injury. *Stroke* 43: 3071-7
- Girard M, Puerta A, Diez-Masa JC, de Frutos M. 2012. High resolution separation methods for the determination of intact human erythropoiesis stimulating agents. A review. *Analytica chimica acta* 713: 7-22
- Grupke S, Hall J, Dobbs M, Bix GJ, Fraser JF. 2015. Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: from review to preview. *Clinical neurology and neurosurgery* 129: 1-9
- Gu L, Xu H, Wang F, Xu G, Sinha D, *et al.* 2014. Erythropoietin exerts a neuroprotective function against glutamate neurotoxicity in experimental diabetic retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 55: 8208-22
- Gulden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. 2010. Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free radical biology & medicine* 49: 1298-305

- Heir P, Srikumar T, Bikopoulos G, Bunda S, Poon BP, *et al.* 2016. Oxygen-dependent Regulation of Erythropoietin Receptor Turnover and Signaling. *The Journal of biological chemistry* 291: 7357-72
- Hernandez CC, Burgos CF, Gajardo AH, Silva-Grecchi T, Gavilan J, *et al.* 2017. Neuroprotective effects of erythropoietin on neurodegenerative and ischemic brain diseases: the role of erythropoietin receptor. *Neural regeneration research* 12: 1381-89
- Hornedo-Ortega R, Da Costa G, Cerezo AB, Troncoso AM, Richard T, Garcia-Parrilla MC. 2018. In Vitro Effects of Serotonin, Melatonin, and Other Related Indole Compounds on Amyloid-beta Kinetics and Neuroprotection. *Molecular nutrition & food research* 62
- Hossler P, Khattak SF, Li ZJ. 2009. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19: 936-49
- Ingley E. 2012. Integrating novel signaling pathways involved in erythropoiesis. *IUBMB life* 64: 402-10
- Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. 2007. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke* 38: 2795-803
- Iwai M, Stetler RA, Xing J, Hu X, Gao Y, *et al.* 2010. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke* 41: 1032-7
- Javadi M, Hofstatter E, Stickle N, Beattie BK, Jaster R, *et al.* 2012. The SH2B1 adaptor protein associates with a proximal region of the erythropoietin receptor. *The Journal of biological chemistry* 287: 26223-34
- Jelkmann W. 2002. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *European journal of haematology* 69: 265-74
- Jelkmann W. 2008. 'O', erythropoietin carbamoylation versus carbamylation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23: 3033; author reply 33-4
- Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. 2008. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Critical reviews in oncology/hematology* 67: 39-61
- Jia Y, Mo SJ, Feng QQ, Zhan ML, OuYang LS, *et al.* 2014. EPO-dependent activation of PI3K/Akt/FoxO3a signalling mediates neuroprotection in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN* 53: 117-24
- Jiang J, Tian F, Cai Y, Qian X, Costello CE, Ying W. 2014. Site-specific qualitative and quantitative analysis of the N- and O-glycoforms in recombinant human erythropoietin. *Analytical and bioanalytical chemistry* 406: 6265-74
- Jo HR, Kim YS, Son H. 2016. Erythropoietin and carbamylated erythropoietin promote histone deacetylase 5 phosphorylation and nuclear export in rat

- hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 470: 220-5
- Kumar A, Singh A, Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports : PR* 67: 195-203
- Li YP, Yang GJ, Jin L, Yang HM, Chen J, *et al.* 2015. Erythropoietin attenuates Alzheimer-like memory impairments and pathological changes induced by amyloid beta42 in mice. *Brain research* 1618: 159-67
- Lourhmati A, Buniatian GH, Paul C, Verleysdonk S, Buecheler R, *et al.* 2013. Age-dependent astroglial vulnerability to hypoxia and glutamate: the role for erythropoietin. *PloS one* 8: e77182
- Lu J, Jiang L, Zhu H, Zhang L, Wang T. 2014. Hypoxia-inducible factor-1alpha and erythropoietin expression in the hippocampus of neonatal rats following hypoxia-ischemia. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 14: 5614-9
- Ma R, Hu J, Huang C, Wang M, Xiang J, Li G. 2014. JAK2/STAT5/Bcl-xL signalling is essential for erythropoietin-mediated protection against apoptosis induced in PC12 cells by the amyloid beta-peptide Abeta25-35. *British journal of pharmacology* 171: 3234-45
- Ma R, Xiong N, Huang C, Tang Q, Hu B, *et al.* 2009. Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology* 56: 1027-34
- Magaki SD, Williams CK, Vinters HV. 2017. Glial function (and dysfunction) in the normal & ischemic brain. *Neuropharmacology* 10.1016/j.neuropharm.2017.11.009
- Maiese K. 2016a. Charting a course for erythropoietin in traumatic brain injury. *Journal of translational science* 2: 140-44
- Maiese K. 2016b. Erythropoietin and mTOR: A "One-Two Punch" for Aging-Related Disorders Accompanied by Enhanced Life Expectancy. *Current neurovascular research* 13: 329-40
- Maiese K. 2016c. Regeneration in the nervous system with erythropoietin. *Frontiers in bioscience* 21: 561-96
- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. 2012. Erythropoietin: new directions for the nervous system. *International journal of molecular sciences* 13: 11102-29
- Maiese K, Li F, Chong ZZ. 2005. New avenues of exploration for erythropoietin. *Jama* 293: 90-5
- Masuda S, Kada E, Nagao M, Sasaki R. 1999a. In vitro neuroprotective action of recombinant rat erythropoietin produced by astrocyte cell lines and comparative studies with erythropoietin produced by Chinese hamster ovary cells. *Cytotechnology* 29: 207-13
- Masuda S, Nagao M, Sasaki R. 1999b. Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *International journal of hematology* 70: 1-6
- Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F, Jr., *et al.* 1993. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison

- with receptor properties of erythroid cells. *The Journal of biological chemistry* 268: 11208-16
- Maurice T, Mustafa MH, Desrumaux C, Keller E, Naert G, *et al.* 2013. Intranasal formulation of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the Abeta(2)(5)(-)(3)(5) non-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of psychopharmacology* 27: 1044-57
- Merelli A, Czornyj L, Lazarowski A. 2015. Erythropoietin as a new therapeutic opportunity in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *The International journal of neuroscience* 125: 793-7
- Miljus N, Heibeck S, Jarrar M, Micke M, Ostrowski D, *et al.* 2014. Erythropoietin-mediated protection of insect brain neurons involves JAK and STAT but not PI3K transduction pathways. *Neuroscience* 258: 218-27
- Miljus N, Massih B, Weis MA, Rison JV, Bonnas CB, *et al.* 2017. Neuroprotection and endocytosis: erythropoietin receptors in insect nervous systems. *Journal of neurochemistry* 141: 63-74
- Millet A, Bouzat P, Trouve-Buisson T, Batandier C, Pernet-Gallay K, *et al.* 2016. Erythropoietin and Its Derivates Modulate Mitochondrial Dysfunction after Diffuse Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma* 33: 1625-33
- Montesino R, Toledo JR, Sanchez O, Sanchez A, Harvey DJ, *et al.* 2008. Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk. *Archives of biochemistry and biophysics* 470: 163-75
- Morimoto K, Tsuda E, Said AA, Uchida E, Hatakeyama S, *et al.* 1996. Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconjugate journal* 13: 1013-20
- Naganska E, Taraszewska A, Matyja E, Grieb P, Rafalowska J. 2010. Neuroprotective effect of erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model in vitro. Ultrastructural study. *Folia neuropathologica* 48: 35-44
- Nekoui A, Blaise G. 2017. Erythropoietin and Nonhematopoietic Effects. *The American journal of the medical sciences* 353: 76-81
- Noh MY, Cho KA, Kim H, Kim SM, Kim SH. 2014. Erythropoietin modulates the immune-inflammatory response of a SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroscience letters* 574: 53-8
- Ojala JO, Sutinen EM. 2017. The Role of Interleukin-18, Oxidative Stress and Metabolic Syndrome in Alzheimer's Disease. *Journal of clinical medicine* 6
- Ott C, Martens H, Hassouna I, Oliveira B, Erck C, *et al.* 2015. Widespread expression of erythropoietin receptor in brain and its induction by injury. *Molecular medicine* 10.2119/molmed.2015.00192
- Pang L, Zhang N, Dong N, Wang DW, Xu DH, *et al.* 2016. Erythropoietin Protects Rat Brain Injury from Carbon Monoxide Poisoning by Inhibiting Toll-Like Receptor 4/NF-kappa B-Dependent Inflammatory Responses. *Inflammation* 39: 561-8

- Pankratova S, Gu B, Kiryushko D, Korshunova I, Kohler LB, *et al.* 2012. A new agonist of the erythropoietin receptor, Epobis, induces neurite outgrowth and promotes neuronal survival. *Journal of neurochemistry* 121: 915-23
- Pankratova S, Kiryushko D, Sonn K, Soroka V, Kohler LB, *et al.* 2010. Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor. *Brain : a journal of neurology* 133: 2281-94
- Parada E, Buendia I, Leon R, Negredo P, Romero A, *et al.* 2014. Neuroprotective effect of melatonin against ischemia is partially mediated by alpha-7 nicotinic receptor modulation and HO-1 overexpression. *Journal of pineal research* 56: 204-12
- Parada E, Buendia I, Navarro E, Avendano C, Egea J, Lopez MG. 2015. Microglial HO-1 induction by curcumin provides antioxidant, antineuroinflammatory, and glioprotective effects. *Molecular nutrition & food research* 59: 1690-700
- Park HH, Lee KY, Kim SH, Lee YJ, Koh SH. 2009. L-DOPA-induced neurotoxicity is reduced by the activation of the PI3K signaling pathway. *Toxicology* 265: 80-6
- Park KH, Choi NY, Koh SH, Park HH, Kim YS, *et al.* 2011. L-DOPA neurotoxicity is prevented by neuroprotective effects of erythropoietin. *Neurotoxicology* 32: 879-87
- Parodi J, Sepulveda FJ, Roa J, Opazo C, Inestrosa NC, Aguayo LG. 2010. Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure. *The Journal of biological chemistry* 285: 2506-14
- Parra AL, Rodriguez JC. 2012. Nasal neuro EPO could be a reliable choice for neuroprotective stroke treatment. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 12: 60-8
- Pasqualetti G, Brooks DJ, Edison P. 2015. The role of neuroinflammation in dementias. *Current neurology and neuroscience reports* 15: 17
- Peters C, Fernandez-Perez EJ, Burgos CF, Espinoza MP, Castillo C, *et al.* 2013. Inhibition of amyloid beta-induced synaptotoxicity by a pentapeptide derived from the glycine zipper region of the neurotoxic peptide. *Neurobiology of aging* 34: 2805-14
- Ponce LL, Navarro JC, Ahmed O, Robertson CS. 2013. Erythropoietin neuroprotection with traumatic brain injury. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology* 20: 31-8
- Qin C, Zhou S, Xiao Y, Chen L. 2014. Erythropoietin enhances mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes exposed to chronic hypoxia through Akt/eNOS signalling pathway. *Cell biology international* 38: 335-42
- Rabie T, Marti HH. 2008. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology* 23: 263-74
- Ramirez AE, Pacheco CR, Aguayo LG, Opazo CM. 2014. Rapamycin protects against Abeta-induced synaptotoxicity by increasing presynaptic activity in hippocampal neurons. *Biochimica et biophysica acta* 1842: 1495-501

- Ratilal BO, Arroja MM, Rocha JP, Fernandes AM, Barateiro AP, *et al.* 2014. Neuroprotective effects of erythropoietin pretreatment in a rodent model of transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of neurosurgery* 121: 55-62
- Rodriguez Cruz Y, Strehaiano M, Rodriguez Obaya T, Garcia Rodriguez JC, Maurice T. 2017. An Intranasal Formulation of Erythropoietin (Neuro-EPO) Prevents Memory Deficits and Amyloid Toxicity in the APPSwe Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 55: 231-48
- Salgado ER, Montesino R, Jimenez SP, Gonzalez M, Hugues F, *et al.* 2015. Post-translational modification of a chimeric EPO-Fc hormone is more important than its molecular size in defining its in vivo hematopoietic activity. *Biochimica et biophysica acta* 1850: 1685-93
- Sargin D, El-Kordi A, Agarwal A, Muller M, Wojcik SM, *et al.* 2011. Expression of constitutively active erythropoietin receptor in pyramidal neurons of cortex and hippocampus boosts higher cognitive functions in mice. *BMC biology* 9: 27
- Sargin D, Friedrichs H, El-Kordi A, Ehrenreich H. 2010. Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology* 24: 573-94
- Sepulveda FJ, Fierro H, Fernandez E, Castillo C, Peoples RW, *et al.* 2014. Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid-beta on hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 35: 472-81
- Sepulveda FJ, Opazo C, Aguayo LG. 2009. Alzheimer beta-amyloid blocks epileptiform activity in hippocampal neurons. *Molecular and cellular neurosciences* 41: 420-8
- Shang YC, Chong ZZ, Wang S, Maiese K. 2012. Prevention of beta-amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI 3-K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging* 4: 187-201
- Shen J, Wu Y, Xu JY, Zhang J, Sinclair SH, *et al.* 2010. ERK- and Akt-dependent neuroprotection by erythropoietin (EPO) against glyoxal-AGEs via modulation of Bcl-xL, Bax, and BAD. *Investigative ophthalmology & visual science* 51: 35-46
- Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. 2015. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of toxicology* 89: 289-317
- Sinclair AM. 2013. Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity. *Biologics : targets & therapy* 7: 161-74
- Stefani A, Martorana A, Bernardini S, Panella M, Mercati F, *et al.* 2006. CSF markers in Alzheimer disease patients are not related to the different degree of cognitive impairment. *Journal of the neurological sciences* 251: 124-8
- Sun YY, Lin SH, Lin HC, Hung CC, Wang CY, *et al.* 2013. Cell type-specific dependency on the PI3K/Akt signaling pathway for the endogenous Epo and VEGF induction by baicalein in neurons versus astrocytes. *PloS one* 8: e69019

- Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, *et al.* 1998. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 395: 511-6
- Terraneo L, Paroni R, Bianciardi P, Giallongo T, Carelli S, *et al.* 2017. Brain adaptation to hypoxia and hyperoxia in mice. *Redox biology* 11: 12-20
- Terraneo L, Samaja M. 2017. Comparative Response of Brain to Chronic Hypoxia and Hyperoxia. *International journal of molecular sciences* 18
- Toledo JR, Sanchez O, Segui RM, Garcia G, Montanez M, *et al.* 2006. High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *Journal of biotechnology* 123: 225-35
- Wang GB, Ni YL, Zhou XP, Zhang WF. 2014. The AKT/mTOR pathway mediates neuronal protective effects of erythropoietin in sepsis. *Molecular and cellular biochemistry* 385: 125-32
- Wang R, Wu X, Liang J, Qi Z, Liu X, *et al.* 2015. Intra-artery infusion of recombinant human erythropoietin reduces blood-brain barrier disruption in rats following cerebral ischemia and reperfusion. *The International journal of neuroscience* 125: 693-702
- Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schratzenholz A, *et al.* 2004. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *Journal of neurochemistry* 91: 900-10
- Won HH, Park I, Lee E, Kim JW, Lee D. 2009. Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach. *BMC bioinformatics* 10 Suppl 1: S53
- Wu JH, Gao Y, Ren AJ, Zhong M, Liu L. 2011. Erythropoietin receptor antibody inhibits oxidative stress induced retinal neovascularization in mice. *International journal of ophthalmology* 4: 243-6
- Yu D, Fan Y, Sun X, Yao L, Chai W. 2016. Effects of erythropoietin preconditioning on rat cerebral ischemia-reperfusion injury and the GLT-1/GLAST pathway. *Experimental and therapeutic medicine* 11: 513-18
- Yu YP, Xu QQ, Zhang Q, Zhang WP, Zhang LH, Wei EQ. 2005. Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neuroscience letters* 387: 5-10
- Zhang H, Qin T, Xu Z, Fang L, Pan L, *et al.* 2014a. [Clinical efficacy analysis of recombinant human erythropoietin in the treatment of lower-risk myelodysplastic syndromes]. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 35: 18-23
- Zhang J, Wang Q, Xiang H, Xin Y, Chang M, Lu H. 2014b. Neuroprotection with erythropoietin in preterm and/or low birth weight infants. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 21: 1283-7
- Zhou TF, Yu JG. 2013. Recombinant human erythropoietin attenuates neuronal apoptosis and cognitive defects via JAK2/STAT3 signaling in experimental endotoxemia. *The Journal of surgical research* 183: 304-12

Zurita MP, Munoz G, Sepulveda FJ, Gomez P, Castillo C, *et al.* 2013. Ibuprofen inhibits the synaptic failure induced by the amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 35: 463-73

