



Efecto protector de la NeuroEPO en la reproducción de ratas diabéticas

Protective effect of NeuroEPO in the reproduction of diabetic rats

Tammy Fernández Romero¹, Sonia Clapés Hernández¹, Carlos Luis Pérez Hernández^{1*}
Nínive Núñez López¹, Gipsis Suárez Román¹, Gisselle Fernández Peña¹

¹Universidad de Ciencias Médicas de la Habana,
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: carlosph@infomed.sld.cu

Cómo citar este artículo

Fernández Romero T, Clapés Hernández S, Pérez Hernández CL, Núñez López N, Suárez Román G, Fernández Peña G. Efecto protector de la NeuroEPO en la reproducción de ratas diabéticas. Rev haban cienc méd [Internet]. 2022 [citado]; 21(4):e4797. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4797>

Recibido: 21 de Marzo de 2022
Aprobado: 28 de Julio de 2022

RESUMEN

Introducción: La diabetes pre-gestacional constituye un riesgo reproductivo, lo que requiere nuevas estrategias de tratamiento. Teniendo en cuenta que la NeuroEPO, una variante de la eritropoyetina recombinante humana producida en Cuba, tiene efectos neuroprotectores e hipoglicemiantes.

Objetivo: Evaluar el efecto protector de la NeuroEPO en la reproducción de ratas diabéticas.

Material y Métodos: Se utilizaron cuatro grupos de ratas Wistar hembras adultas, con diabetes inducida por estreptozotocina. Durante la gestación, un grupo recibió el vehículo y el resto diferentes dosis de NeuroEPO (0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg y 1 mg/kg), por vía subcutánea, en días alternos, para un total de seis aplicaciones. Se empleó un grupo de ratas no-diabéticas como control. Se evaluó la glicemia y variables reproductivas. Para las comparaciones se empleó el Análisis de Varianza y la Prueba Exacta de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas con valores de p menores que 0,05.

Resultados: El grupo con vehículo presentó hiperglicemia mantenida, menor número de implantaciones y embriones, e incremento de las pérdidas gestacionales. En el grupo que recibió 0,5 mg/kg de NeuroEPO, la glicemia disminuyó de forma significativa y los resultados de las variables reproductivas fueron similares al grupo de ratas no-diabéticas. Con las dosis superiores de NeuroEPO se incrementaron las pérdidas gestacionales. No se identificaron malformaciones congénitas en ninguno de los grupos.

Conclusiones: La administración reiterada de 0,5 mg/kg de NeuroEPO tiene efecto beneficioso en la reproducción de ratas diabéticas, que puede estar asociado a la reducción de la hiperglicemia. Otros mecanismos citoprotectores de la NeuroEPO deben ser evaluados en futuros estudios.

Palabras claves:

Diabetes pre-gestacional, diabetes inducida por estreptozotocina, NeuroEPO, variables reproductivas en ratas.

ABSTRACT

Introduction: Pregestational diabetes constitutes a reproductive risk which requires new treatment strategies. NeuroEPO, a variant of the recombinant human erythropoietin produced in Cuba, has neuroprotective and hypoglycemic effects which can be considered for the treatment of this entity.

Objective: To evaluate the protective effect of NeuroEPO on the reproduction of diabetic rats.

Material and Methods: Four groups of adult female Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes were used. During pregnancy, one group received the vehicle and the rest of the groups received different doses of NeuroEPO (0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, and 1 mg/kg) subcutaneously, on alternate days, for a total of six applications. A group of non-diabetic rats was used as a control group. Glycemia and reproductive variables were evaluated. For comparisons, Analysis of Variance and Fisher's Exact Test were used. There were significant differences with p-values less than 0,05.

Results: The group with vehicle presented maintained hyperglycemia, fewer implantations, and embryos, and increased gestational losses. In the group receiving 0,5 mg/kg of NeuroEPO, glycemia decreased significantly and the results of the reproductive variables were similar to the group of non-diabetic rats. With higher doses of NeuroEPO, gestational losses were increased. No congenital malformations were identified in either group.

Conclusions: The repeated administration of 0,5 mg/kg of NeuroEPO has a beneficial effect on the reproduction of diabetic rats, which may be associated with the reduction of hyperglycemia. Other cytoprotective mechanisms of NeuroEPO should be evaluated in future studies.

Keywords:

Pre-gestational diabetes, streptozotocin-induced diabetes, NeuroEPO, reproduction, reproductive variables in rats.



INTRODUCCIÓN

Al nivel mundial, la *Diabetes Mellitus* (diabetes) y sus complicaciones se encuentran entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad, por lo que constituye un creciente problema para la salud pública y las economías nacionales.⁽¹⁾ En Cuba, la diabetes presenta un incremento de la incidencia y la prevalencia, y se encuentra entre las 10 primeras causas de muerte en todas las edades.⁽²⁾

Las embarazadas con diabetes pre-gestacional e inadecuado control glicémico presentan una elevada incidencia de anomalías del desarrollo embrionario, fetal y placentario; las malformaciones congénitas son frecuentes e incrementan la morbilidad y mortalidad perinatal.^(3,4,5,6)

Los mecanismos mediante los cuales se producen las complicaciones en la gestación de la mujer diabética no están totalmente esclarecidos, pero se relacionan con el ambiente intrauterino pro-oxidante y pro-inflamatorio provocado por los trastornos metabólicos. La hiperglicemia materna se asocia a estrés oxidativo, estado hipóxico del embrión y cambios en la regulación de vías apoptóticas, todo lo cual altera eventos de señalización cruciales durante el desarrollo prenatal, la expresión de genes relacionados con la morfogénesis y la integridad del material genético.^(4,5,6)

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína cuya función primaria es estimular la eritropoyesis. Sin embargo, se ha demostrado que la EPO tiene también efectos citoprotectores en tejidos no hematopoyéticos, por acciones angiogénicas, antiapoptóticas, antiinflamatorias, neurotróficas y antioxidantes.⁽⁷⁾

Por otra parte, existen evidencias de que la EPO se expresa tempranamente en varias de las estructuras del embrión⁽⁸⁾ y que estimula la proliferación e inhibe la apoptosis en células de la decidua y el trofoblasto,⁽⁹⁾ mecanismos necesarios para la morfogénesis adecuada. Además, se ha observado que la EPO recombinante humana (rhuEPO) reduce la glicemia en condiciones de hiperglicemia, por lo que se han incrementado las investigaciones sobre su potencial papel citoprotector en la diabetes.^(10,11,12)

La activación de los receptores de la EPO en tejidos no hematopoyéticos requiere concentraciones de EPO mayores que las necesarias para estimular la eritropoyesis. Las altas dosis de rhuEPO producen efectos adversos asociados a la estimulación de vías hematopoyéticas y pro-coagulantes,⁽⁷⁾ por lo que se han desarrollado derivados que potencian los efectos citoprotectores, sin acciones hematopoyéticas.⁽¹³⁾

En el Centro de Inmunología Molecular de Cuba, durante la producción de la rhuEPO se obtiene una variante hiposialica conocida como NeuroEPO. El empleo de una formulación nasal de dicha molécula ha mostrado neuroprotección en la isquemia cerebral^(14,15) y en enfermedades neurodegenerativas,^(16,17) sin efectos adversos al nivel hematológico. Además, nuestro grupo ha comprobado que la NeuroEPO reduce la hiperglicemia en ratas diabéticas.⁽¹⁸⁾

Teniendo en cuenta las evidencias del efecto citoprotector^(14,15,16,17) e hipoglicemiante⁽¹⁸⁾ de la NeuroEPO, la implicación de la EPO en el desarrollo embrionario,^(8,9) y que existen reportes de que la rhuEPO puede atravesar la placenta,⁽¹⁹⁾ el **objetivo** de esta investigación es evaluar el efecto protector de la NeuroEPO en la reproducción de ratas diabéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental en ratas Wistar, obtenidas del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de Cuba, siguiendo los preceptos éticos establecidos.^(20,21) La investigación se desarrolló en el departamento de Bioquímica del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", en el período de 2019 a 2021. En cada grupo se empleó un número de animales similar al menor número utilizado en estudios experimentales previos de diabetes y preñez en ratas.^(22,23)

Animales y condiciones ambientales

Se emplearon ratas hembras, fértiles y vírgenes, con peso inicial de 200 g ± 20 g, que fueron mantenidas en cajas independientes, con ciclos constantes de luz y oscuridad, a una temperatura de 21 - 23 °C, y con libre acceso a alimento estándar (CENPALAB) y agua filtrada. Los animales se mantuvieron durante una semana en adaptación al medio antes de comenzar los procedimientos.

Inducción de la diabetes

Para provocar la diabetes en las ratas, se administró una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (SIGMA), 65 mg/kg en 200 µL de buffer citrato de sodio 0,1 M pH 4,5; una semana después se determinó la glicemia y se consideraron diabéticas las ratas con glicemia superior a 11 mM.⁽²⁴⁾ La glicemia se determinó con un glucómetro (SUMA), en sangre obtenida mediante un corte en la punta de la cola del animal.

Inducción de la preñez

Las ratas diabéticas y un grupo de ratas no diabéticas fueron apareadas durante la noche, en las fases proestro y estro del ciclo estral.⁽²⁵⁾ Se consideró el día 0 de la gestación cuando se encontraron espermatozoides en el lavado vaginal realizado en la mañana posterior al apareamiento.

Grupos de estudio

El día 0 de la gestación, las ratas fueron asignadas de forma aleatoria a los grupos de estudio. Cada grupo quedó constituido por 8 animales.

1. D 0,5: ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO 0,5 mg/kg.
2. D 0,75: ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO 0,75 mg/kg.
3. D 1: ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO 1 mg/kg.
4. DV: ratas diabéticas que recibieron el vehículo.
5. C: ratas no-diabéticas controles.

La NeuroEPO y el vehículo fueron suministrados por el Centro de Inmunología Molecular de Cuba. Ambos preparados se administraron por vía subcutánea, en la región dorsal de las ratas, una vez al día, en días alternos, comenzando el día 0 de la gestación, para un total de 6 aplicaciones.

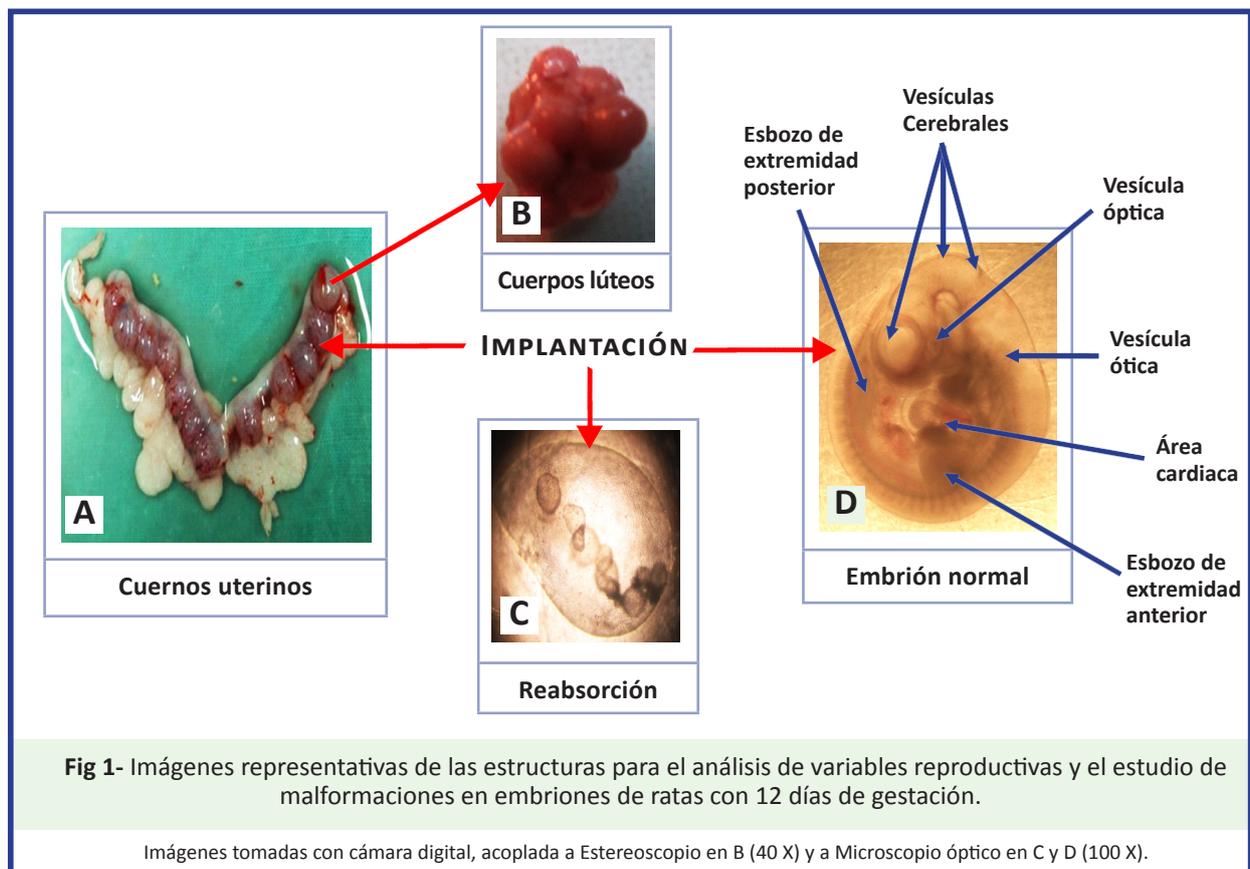
Eutanasia y recogida de muestras

El día 12 de la gestación se realizó la eutanasia de las ratas por desangrado (punción intracardiaca) bajo anestesia (tiopental sódico 50 mg/kg intraperitoneal). Se realizó la disección de los cuernos uterinos y los ovarios, que se colocaron en una placa Petri (100 mm) a temperatura ambiente. Con ayuda de tijeras, pinzas y estereoscopio (Motic), se eliminó el tejido periuterino, la pared del útero se abrió en toda su longitud y se retiraron cuidadosamente todas las membranas.⁽²⁶⁾

Variables

Se determinó la glicemia de las ratas diabéticas, los días 0, 6 y 12 de la gestación, mediante glucómetro (SUMA), en sangre obtenida por un corte en la punta de la cola. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la glicemia inicial (%), considerada como 100 %⁽²⁴⁾ y correspondió con la glicemia del día 0 de la gestación.

Con ayuda de estereoscopio y microscopio óptico (Motic), se realizó el conteo de cuerpos lúteos, implantaciones, reabsorciones y embriones.^(22,26) En los embriones se analizó la presencia o no de malformaciones (defectos de cierre del tubo neural, alteraciones en las vesículas cerebrales, ópticas y óticas, los esbozos de las extremidades, el área cardiaca y el plegamiento embrionario)⁽²⁶⁾ (Fig. 1). Se calculó el total de pérdidas (número de cuerpos lúteos – número de embriones), así como el porcentaje de pérdidas pre-implantación [(número de cuerpos lúteos – número de implantaciones) X 100/número de cuerpos lúteos] y pos-implantación [(número de implantaciones – número de embriones) X 100/número de implantaciones].⁽²²⁾



Procesamiento estadístico

Se trabajó con el programa GraphPad Prism, versión 5.01. Para las comparaciones de los niveles de glicemia se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una y de dos vías, y para el área bajo la curva ANOVA de una vía; en cada caso se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para el análisis de las variables reproductivas se emplearon las pruebas ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de Newman-Keuls, así como la prueba exacta de Fisher para la comparación de proporciones. Las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0,05$.

Los datos primarios de esta investigación se encuentran depositados en Mendeley Data como principio de acceso abierto a la información.⁽²⁷⁾

El proyecto fue aprobado por el Consejo Científico y el Comité de Ética de la Investigación de la institución.

RESULTADOS

Las ratas diabéticas de todos los grupos iniciaron la gestación con niveles de glicemia superiores a 300 mg/dL (16,7 mM). Durante la gestación, la glicemia en el grupo DV se mantuvo en niveles similares, mientras que en D 0,5 se redujo de forma significativa con respecto a la glicemia inicial y a la del grupo DV, con una menor área bajo la curva. La disminución de la glicemia en D 0,5 fue evidente desde el día 6 de la gestación, y llegó a ser de 27 % el día 12 de la gestación (Fig. 2).

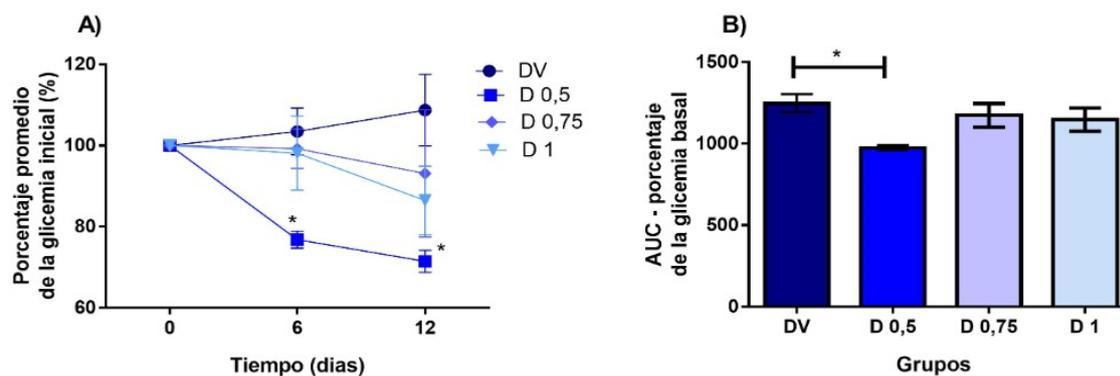


Fig. 2- Glicemia de ratas diabéticas con diferentes dosis de NeuroEPO o vehículo:

A) En cada tiempo se muestra el porcentaje con respecto a la glicemia inicial (tiempo 0).
 B) Área bajo la curva (AUC). Se presentan los valores de la media y la desviación estándar (n= 8 en cada grupo).
 DV: ratas diabéticas + vehículo; D 0,5, D 0,75 y D1: ratas diabéticas + 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg y 1 mg/kg de NeuroEPO, respectivamente. Vía de administración subcutánea, en días alternos, desde el día 0 hasta el 10 de la gestación (6 aplicaciones).

* p < 0,05- Diferencia significativa con respecto a la glicemia basal (A) y al grupo DV (A y B). (Análisis de varianza ANOVA de una y dos vías (A) y de una vía (B), y prueba de Bonferroni).

El estudio de variables reproductivas en las ratas evidenció un número similar de cuerpos lúteos en todos los grupos. En el grupo DV, el número de implantaciones y de embriones fueron menores, y las pérdidas de la gestación mayores, al comparar con el grupo C. En el grupo D 0,5 los resultados de todas las variables fueron similares al grupo C, con un incremento del número de embriones y una reducción de las pérdidas con respecto al grupo DV (**Tabla 1**).

En los grupos D 0,75 y D1 el número de implantaciones, de embriones y de pérdidas fueron similares a los encontrados en DV, con diferencias significativas tanto al comparar con C como con D 0,5. Además, en D 0,75 y D 1 el porcentaje de embriones por implantaciones fue inferior y el porcentaje de pérdidas por cuerpos lúteos superior a lo observado en el resto de los grupos (**Tabla 1**).

Tabla 1- Resultado de variables reproductivas de ratas diabéticas que recibieron diferentes dosis de NeuroEPO durante la gestación y sus controles

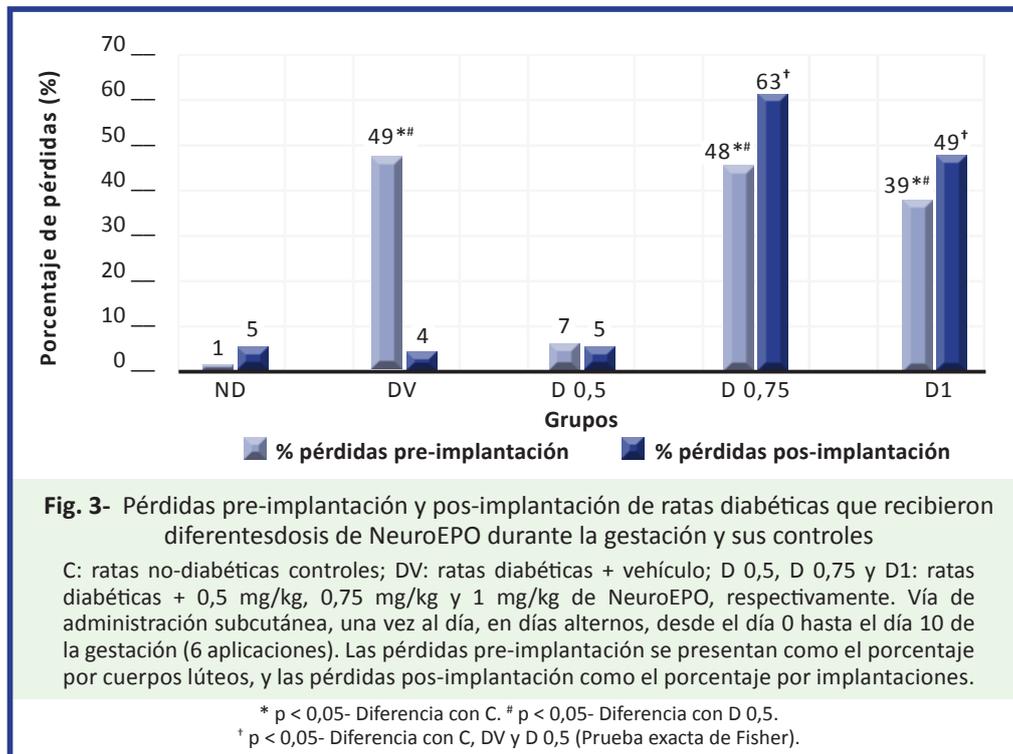
Variable	C	DV	D 0,5	D 0,75	D 1
Cuerpos lúteos N	101	91	91	83	87
media ± SD	12,6 ± 2,4	11,4 ± 2,9	11,4 ± 1,8	10,4 ± 2,6	10,9 ± 2,0
Implantaciones N	100	46	85	43	53
media ± SD	12,5 ± 2,3	5,8 ± 5,2*	10,6 ± 2,2	5,4 ± 4,2*	6,6 ± 5,6*
Embriones N	95	44	81	16	27
media ± SD	11,9 ± 2,5	5,5 ± 4,9*#	10,1 ± 2,2	2,0 ± 4,0*#	3,4 ± 4,7*#
% por implantaciones	95,0	95,6	95,3	37,2 †	50,9 †
Pérdidas totales N	6	47	10	67	60
media ± SD	0,8 ± 0,7	5,9 ± 4,4*#	1,3 ± 1,4	8,4 ± 4,1*#	7,5 ± 5,4*#
% por cuerpos lúteos	5,9	51,6*#	11,0	80,7 †	69,0 †

N: número; DS: desviación estándar. C: ratas no-diabéticas controles; DV: ratas diabéticas + vehículo; D 0,5, D 0,75 y D1: ratas diabéticas + 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg y 1 mg/kg de NeuroEPO, respectivamente. Vía de administración subcutánea, en días alternos, desde el día 0 hasta el día 10 de la gestación (6 aplicaciones). Se presentan los valores de la media ± DS (Análisis de varianza ANOVA de una vía prueba de Newman-Keuls) y el porcentaje (%) (Prueba exacta de Fisher).

* p < 0,05- Diferencia con C. # p < 0,05- Diferencia con D 0,5. † p < 0,05- Diferencia con C, DV y D 0,5.

Un estudio más detallado de las pérdidas reveló que en los grupos DV, D 0,75 y D 1, en los que se encontró un incremento del resultado de esta variable (**Tabla 1**), el porcentaje de pérdidas pre-implantación fue superior al observado en C y D 0,5. Además, al comparar el porcentaje de pérdidas pos-implantación, el grupo DV no presentó diferencias con C y D 0,5, pero los grupos D 0,75 y D1 mostraron un incremento con respecto al resto de los grupos (**Fig. 3**).

En el estudio de los embriones no se identificaron malformaciones congénitas en ninguno de los grupos.



DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar si la NeuroEPO ofrece protección en la reproducción de ratas diabéticas, se investigó su efecto en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina. Las ratas inyectadas con estreptozotocina desarrollaron una hiperglicemia severa, que se redujo de forma significativa con la administración repetida de 0,5 mg/kg de NeuroEPO. El resultado coincide con la reducción de la hiperglicemia observada en ratas diabéticas luego de una aplicación única de igual dosis de NeuroEPO,⁽¹⁸⁾ lo cual confirma el efecto hipoglicemiante de este producto de la biotecnología cubana.

En el reporte previo sobre el efecto hipoglicemiante de la NeuroEPO, los resultados sugieren una acción insulino-trópica de esta molécula,⁽¹⁸⁾ que concuerda con investigaciones realizadas con la EPO exógena en ratas diabéticas.^(10,11)

Otros estudios han demostrado que la EPO administrada a ratas diabéticas reduce la intensidad de la gluconeogénesis hepática,^(10,28) y ejerce un efecto citoprotector directo sobre los islotes pancreáticos.^(11,29,30) Mecanismos similares pudieran estar implicados en la disminución de la glicemia en el grupo D 0,5, los cuales deben ser comprobados en investigaciones futuras.

Por otra parte, se conoce que la hiperglicemia tiene efectos perjudiciales en el ovario y que en el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina la fertilidad de los animales disminuye de forma progresiva e irreversible.⁽³¹⁾ Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos en cuanto al número de cuerpos lúteos, que constituye un indicador indirecto del número de ovocitos fecundados.⁽²²⁾ El resultado puede deberse a que todas las ratas diabéticas se preñaron durante las dos semanas posteriores al diagnóstico de la diabetes, lo cual puede ser un tiempo corto para que se manifiesten los daños al nivel de los ovarios.

El grupo DV, además de desarrollar hiperglicemia severa mantenida durante el experimento, presentó menor número de implantaciones y embriones, así como incremento de las pérdidas pre-implantación, que son características del modelo empleado, ampliamente utilizado en estudios de diabetes y preñez.^(22,23,26,32) En este modelo está demostrado que las alteraciones de la reproducción dependen de la hiperglicemia materna y no de la estreptozotocina; esta sustancia se elimina de la circulación pocas horas después de su administración,⁽³¹⁾ por lo que no tiene efectos sobre la reproducción cuando se administra previo a la gestación. Sin embargo, las estructuras embrionarias expuestas a un exceso de glucosa presentan un mayor consumo de oxígeno, lo que consolida el estado hipóxico que caracteriza las primeras etapas del desarrollo embrionario; el establecimiento de un estado hipóxico produce estrés oxidativo, lo cual está implicado en las alteraciones de la reproducción de la madre diabética.^(4,5,6)

Las alteraciones en la descendencia de la madre diabética se relacionan con desregulación de los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis.^(4,5,6) La apoptosis de células del blastocisto puede conducir a fallos en la implantación,⁽⁴⁾ que se traducen en un incremento de las pérdidas pre-implantación y disminución del número de embriones, como se observó en el grupo DV.

Otra característica de este modelo es el aumento de las pérdidas pos-implantación, que equivalen a los abortos y las muertes fetales en las embarazadas diabéticas.⁽³⁾ Sin embargo, en el presente estudio no se observó incremento del porcentaje de pérdidas pos-implantación en el grupo DV; este resultado pudiera deberse a que el análisis de esta variable se realizó teniendo en cuenta solo las reabsorciones presentes en los sacos gestacionales. La ausencia de sacos gestacionales no significa que no hubo implantación, ya que pueden ocurrir pérdidas poco tiempo después de la implantación⁽²²⁾ y no se detecten sacos gestacionales a los 12 días de gestación. Por lo anterior, es probable que parte de las pérdidas pre-implantación identificadas en el estudio correspondan a pérdidas pos-implantación.

Otros resultados que hacen pensar en la posibilidad de un incremento no detectado de las pérdidas pos-implantación en el grupo DV son el menor número de embriones y la ausencia de malformaciones congénitas. Se sabe que los embriones con malformaciones severas no sobreviven,^(4,5,6) por lo que pueden haber ocurrido pérdidas embrionarias poco tiempo después de la implantación.

En el grupo D 0,5 se observó un incremento del número de implantaciones y embriones, y una disminución de las pérdidas, a niveles similares a los observados en las ratas no-diabéticas. Sin embargo, las dosis superiores de NeuroEPO evaluadas (grupos D 0,75 y D 1) no evitaron los efectos negativos de la diabetes en las variables reproductivas e incrementaron las reabsorciones, con un menor porcentaje de embriones, lo cual evidencia un efecto perjudicial de altas dosis.

Los efectos beneficiosos observados en el grupo D 0,5 pueden deberse al mejor control glicémico de las ratas madres. Sin embargo, se ha comprobado que, durante el desarrollo embrionario, la EPO no solo es indispensable para la maduración del sistema hematopoyético, sino también para la proliferación y supervivencia de otras líneas celulares.^(8,9) Además, existen reportes de que la EPO materna puede atravesar la placenta.⁽¹⁹⁾ Por otra parte, se ha demostrado que la NeuroEPO produce neuroprotección en modelos de isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas, por mecanismos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos.^(14,15,16,17) Por tanto, es posible que la NeuroEPO administrada a las ratas diabéticas durante la gestación, llegara a las estructuras embrionarias y ejerciera un efecto citoprotector directo en el control de procesos implicados en la morfogénesis, con efectos beneficiosos en la reproducción.

Estudios *in vitro* e *in vivo* con la NeuroEPO y otras EPO han mostrado curvas concentración-respuesta y dosis-respuesta en forma de campana.^(33,34,35) Además, Rodríguez Cruz y colaboradores⁽¹⁷⁾ reportaron que, en un modelo de enfermedad de Alzheimer, los beneficios de la NeuroEPO fueron mayores con la dosis más baja; con la dosis más alta algunos resultados mostraron más alteraciones que en el grupo con vehículo, similar a lo observado en el presente estudio.

Como se comentó previamente, la apoptosis incrementada es un mecanismo que subyace en las alteraciones de la reproducción asociadas a la diabetes,^(4,5,6) por lo que la acción antiapoptótica de la NeuroEPO^(14,15,16,17) sería beneficiosa en estas condiciones. Sin embargo, la apoptosis es un mecanismo que se requiere para equilibrar la proliferación celular durante la morfogénesis y el desarrollo; la eliminación de células redundantes de la masa celular interna del blastocisto, el desarrollo de las células de las crestas neurales, así como el cierre del tubo neural y el paladar, son ejemplos de procesos en los que está implicada la apoptosis.⁽³⁶⁾ Por lo anterior, la acción antiapoptótica de la NeuroEPO pudiera mediar en los efectos beneficiosos observados en las ratas diabéticas con la dosis 0,5 mg/kg, pero pudiera provocar alteraciones embrionarias incompatibles con la vida con dosis superiores.

CONCLUSIONES

La administración repetida de 0,5 mg/kg de NeuroEPO tiene un efecto beneficioso en la reproducción de ratas diabéticas, que puede estar asociado a la reducción de la hiperglicemia. Otros mecanismos citoprotectores de la NeuroEPO deben ser evaluados en futuros estudios.

AGRADECIMIENTOS

A los profesionales del Centro de Inmunología Molecular de Cuba, en particular a la Dra. Teresita Rodríguez, por proporcionar la NeuroEPO y el vehículo para la realización del estudio. Al personal técnico del Bioterio del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", por la atención y manejo de los animales. Al Dr. Víctor M. Rodríguez, por su contribución en los procedimientos de cirugía experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Licea ME, Acosta A, Álvarez VA, Aldana D, Arnold Y, Álvarez Y, et al. Diabetes mellitus. Una mirada integral [Internet]. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2021 [Citado 21/01/2022]. Disponible en: <http://www.bvscuba.sld.cu/libro/diabetes-mellitus-una-mirada-integral//>
2. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de salud 2019 [Internet]. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2020 [Citado 21/01/2022]. Disponible en: <http://files.sld.cu/bvscuba/files/2020/05/Anuario-Electrónico-Español-2019-ed-2020.pdf>
3. Yu L, Zeng XL, Cheng ML, Yang GZ, Wang B, Xiao ZW, et al. Quantitative assessment of the effect of pre-gestational diabetes and risk of adverse maternal, perinatal and neonatal outcomes. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(37):61048-56. Disponible en: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.17824>
4. Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Kermit R. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. *Birth Defects Research (Part C)* [Internet]. 2015;105:53-72. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/bdrc.21090>
5. Eriksson UJ, Wentzel P. The status of diabetic embryopathy *Upsala Journal of Medical Sciences* [Internet]. 2015;121(2):96-112. Disponible en: <http://doi.org/10.3109/03009734.2016.1165317>

6. Loeken MR. Mechanisms of congenital malformations in pregnancies with pre-existing diabetes. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2020;20(10):54. Disponible en: <http://doi.org/10.1007/s11892-020-01338-4>
7. Suresh S, Rajvanshi PK, Noguchi CT. The many facets of erythropoietin physiologic and metabolic response. *Front Physiol* [Internet]. 2020;10:1534. Disponible en: <http://doi.org/10.3389/fphys.2019.01534>
8. Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(35):25875-83. Disponible en: <http://doi.org/10.1074/jbc.M701988200>
9. Ji YQ, Zhang YQ, Li MQ, Du MR, Wei WW, Li DJ. EPO improves the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast and decidual stromal cells through activating STAT-5 and inactivating p38 signal in human early pregnancy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(8):765-74.
10. Niu HS, Shan Ch, Niu Sh, Cheng J, Lee K. Erythropoietin ameliorates hyperglycemia in type 1-like diabetic rats. *Drug Des Dev Ther* [Internet]. 2016;10:1877-84. Disponible en: <http://doi.org/10.2147/DDDT.S1058677>
11. Kuo Sh, Li Y, Cheng KcH, NiuCh, Cheng J, Niu H. Investigation of the pronounced erythropoietin-induced reduction in hyperglycemia in type 1-like diabetic rats. *Endocr J* [Internet]. 2018;65(2):181-91. Disponible en: <http://doi.org/10.1507/endocr.EJ17-0353>
12. EL Okela AZ, El Arbagy AR, Yasseinb YS, Khodirc, Kasemb HE. Effect of erythropoietin treatment on hemoglobin A1c levels in diabetic patients with chronic kidney disease. *J Egypt Soc Nephrol Transplant* [Internet]. 2019;19(3):86-94. Disponible en: http://doi.org/10.4103/jesnt.jesnt_2_19
13. Peng B, Kong G, Yang C, Ming Y. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. *Cell Death Dis* [Internet]. 2020;11(2):2-12. Disponible en: <http://doi.org/10.1038/s41419-020-2276-8>
14. Garzón F, Rodríguez Y, García JC, Rama R. Neuroprotective effects of NeuroEPO using an in vitro model of stroke. *Behav Sci (Basel)* [Internet]. 2018;8(26):1-11. Disponible en: <http://doi.org/10.3390/bs8020026>
15. Garzón F, Coimbra D, Parcerisa A, Rodríguez Y, García JC, Soriano E, et al. NeuroEPO preserves neurons from glutamate-induced excitotoxicity. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2018;65(4):1469-83. Disponible en: <http://doi.org/10.3233/JAD-180668>
16. Rama R, Garzón F, Rodríguez Cruz Y, Maurice T, García Rodríguez JC. Neuroprotective effect of Neuro-EPO in neurodegenerative diseases: "Aleajactaest". *Neural Regen Res* [Internet]. 2019;14(9):1519-21. Disponible en: <http://doi.org/10.4103/1673-5374.255968>
17. Rodríguez Y, Strehaiano M, Rodríguez T, García JC, Maurice T. An intranasal formulation of erythropoietin (Neuro-EPO) prevents memory deficits and amyloid toxicity in the APPSwe transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2017;55(1):231-48. Disponible en: <http://doi.org/10.3233/JAD-160500>
18. Fernández Romero T, Clapés Hernández S, Pérez Hernández CL, Barreto López JJ, Fernández Peña G. Efecto hipoglicemiante de la NeuroEPO en ratas con y sin diabetes mellitus. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2022 [Citado 21/01/2022];21(1):e4617. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4617>
19. Yilmaz O, Lambrecht FY, Gokmen N, Erbayraktar S, Durkan K. Distribution of ¹³¹I-labeled recombinant human erythropoietin in maternal and fetal organs following intravenous administration in pregnant rats. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [Internet]. 2007;273(2):311-3. Disponible en: <http://doi.org/10.1007/s10967-007-6859-y>
20. Kaushik K, Vaswani R. Research on animals and current UGC guidelines on animal dissection and experimentation: A critical analysis. *Bioethics Update* [Internet]. 2018;4(2):119-39. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.bioet.2018.05.001>
21. McCormick Ell J, Connell N. Laboratory safety, biosecurity and responsible animal use. *ILAR J* [Internet]. 2019;60(1):24-33. Disponible en: <http://doi.org/10.1093/ilar/ilz012>
22. Sinzato YK, Kloppel E, Miranda CA, Paula VG, Alves LF, Nascimento LLS, et al. Comparison of streptozotocin-induced diabetes at different moments of the life of female rats for translational studies. *Laboratory Animals* [Internet]. 2021;1:1-11. Disponible en: <http://doi.org/10.1177/00236772211001895>
23. Karwasik Kajszczyrak K, Chmiel Perzyńska I, Marcin J, Billewicz Kraczkowska A, Pedrycz A, Smoleń A, et al. Impact of experimental diabetes and chronic hypoxia on rat fetal body weight. *Ginekologia Polska* [Internet]. 2018;89(1):20-4. Disponible en: <http://doi.org/10.5603/GPa2018.0004>
24. Quinna NA, Badwan AA. Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. *Drug Design, Development and Therapy* [Internet]. 2015;9:2515-25. Disponible en: <http://doi.org/10.2147/DDDT.S79885>
25. Fernández T, Suárez G, Clapés S. Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2021 [Citado 21/01/2022];20(3): e4086. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4086>
26. Fernández T, Clapés S, Suárez G, Perera A, Rodríguez VM, Purón CA, et al. Embriopatía diabética en ratas y efecto de un suplemento nutricional de vitamina E durante la gestación. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2013 [Citado 21/01/2022];12(2): [Aprox.1p.]. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/56>
27. Fernández Romero T, Clapes S, Pérez CL, Núñez López N, Suárez Román G, Fernández G. Protective effect of NeuroEPO on the reproduction of diabetic rats [Internet]. Amsterdam: Mendeley Data; 2022 [Citado 21/01/2022]. Disponible en: <https://www.data.mendeley.com/datasets/dvk9rtwccy/1>
28. Pan Y, Hong X, Li L, Hong Y, Yan Q, Min H, et al. Erythropoietin reduces insulin resistance via regulation of its receptor-mediated signaling pathways in db/db mice skeletal muscle. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2017;13(10):1329-40. Disponible en: <http://doi.org/10.7150/ijbs.19752>
29. El Desouki NI, Tabl GA, Abdel Aziz KK, Salim EI, Nazeeh N. Improvement in beta-islets of Langerhans in alloxan-induced diabetic rats by erythropoietin and spirulina. *The Journal of Basic and Applied Zoology* [Internet]. 2015;71:20-31. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.04.003>

30. Chen L, Sun Q, Liu S, Hu H, Lv J, Ji W, et al. Erythropoietin improves glucose metabolism and pancreatic β -cell damage in experimental diabetic rats. *Molecular Medicine Reports* [Internet]. 2015;12:5391-98. Disponible en: <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4006>
31. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes- A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico Biological Interactions* [Internet]. 2016;244:49-63. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.11.032>
32. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocrine Reviews* [Internet]. 2010;31(5):680-701. Disponible en: <http://doi.org/10.1210/er.2009-0038>
33. Weishaupt JH, Rohde G, Pölking E, Siren AL, Ehrenreich H, Bähr M. Effect of Erythropoietin Axotomy-Induced Apoptosis in Rat Retinal Ganglion Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1514-22.
34. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, et al. Human Erythropoietin Induces a Pro-Angiogenic Phenotype in Cultured Endothelial Cells and Stimulates Neovascularization In Vivo. *Blood*. 1999;93(8):2627-36.
35. Teste IS, Tamos YM, Cruz YR, Cernada AM, Rodríguez JC, Martínez NS, et al. Dose effect evaluation and therapeutic window of the neuro-EPO nasal application for the treatment of the focal ischemia model in the Mongolian gerbil. *Scientific World Journal* [Internet]. 2012 [Citado 21/01/2022];2012:607498. Disponible en: <http://europemc.org/abstract/MED/22701364>
36. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research* [Internet]. 2020 [Citado 21/01/2022];9:[Aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://www.pmc/articles/PMC7047912/>

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Contribución de autoría

Tammy Fernández Romero: Conceptualización, curación de datos, análisis formal, adquisición de fondos, investigación, metodología, administración del proyecto, redacción del borrador original, redacción, revisión y edición.

Sonia Clapés Hernández: Conceptualización, curación de datos, análisis formal, adquisición de fondos, administración del proyecto, redacción del borrador original, redacción, revisión y edición.

Carlos Luis Pérez Hernández: Curación de datos, análisis formal redacción del borrador original, redacción, revisión y edición.

Nínive Núñez López: Curación de datos, análisis formal, investigación, redacción del borrador original, redacción, revisión y edición.

Gipsis Suárez Román: Curación de datos, análisis formal, investigación, redacción del borrador original, redacción, revisión y edición.

Gisselle Fernández Peña: Curación de datos, análisis formal, redacción del borrador original, redacción, revisión y edición.

Todos los autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final.