(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 662 385**

(51) Int. CI.:

A61K 35/19 (2015.01)
A61K 35/16 (2015.01)
A61K 9/72 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2013 PCT/ES2013/000176**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14023860**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2013 E 13756518 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2883569**

(54) Título: **Composición con factores de crecimiento destinada al tratamiento intranasal de una enfermedad neurodegenerativa**

(30) Prioridad:

09.08.2012 ES 201200810

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2018

(73) Titular/es:

BIOTECHNOLOGY INSTITUTE, I MAS D, S.L. (100.0%)
San Antonio 15 5°
01005 - Vitoria-Gasteiz, Álava ES

(72) Inventor/es:

ANITUA ALDECOA, EDUARDO

(74) Agente/Representante:

TRIGO PECES, José Ramón

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición con factores de crecimiento destinada al tratamiento intranasal de una enfermedad neurodegenerativa.

Sector de la técnica

La invención se define en las reivindicaciones 1 a 4 y se refiere a una composición obtenida a partir de al menos un compuesto sanguíneo con factores de crecimiento, destinada al tratamiento por vía intranasal de una enfermedad neurodegenerativa.

Estado de la técnica

En el estado de la técnica es conocida de forma muy extensa la preparación de composiciones a partir de compuestos sanguíneos que contienen factores de crecimiento, obtenidos a partir de la sangre de un paciente. Dichas composiciones han demostrado ofrecer propiedades biológicas muy importantes, especialmente relacionadas con el desencadenamiento y favorecimiento de la regeneración de tejidos, la disminución del dolor en cierto tipo de dolencias y enfermedades, y otras múltiples utilidades. Por ejemplo, algunos usos muy extendidos de composiciones obtenidas a partir de compuestos sanguíneos ricos en factores de crecimiento han sido la regeneración de hueso alveolar en cavidades orales durante procedimientos implantológicos y otros, la regeneración de tejidos del aparato locomotor (músculos, articulaciones, tendones, etc.) y otros.

En cuanto al tipo de composiciones ricas en factores de crecimiento conocidas, a modo de ejemplo, se conoce la solicitud de patente WO0044314A1 y la solicitud de patente WO2010130851A2, ambas a favor del propio solicitante de la presente invención. Estas patentes se refieren a procedimientos de preparación de un gel de plasma sanguíneo autólogo, rico en factores de crecimiento, a partir de la propia sangre del paciente. Ambos procedimientos comparten pasos comunes como son el centrifugado de la sangre del paciente, la separación de plasma rico en plaquetas y la adición de cloruro de calcio al plasma rico en plaquetas para producir la activación del plasma (la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas contenidas en el plasma) y para producir la coagulación del mismo hasta que el plasma adquiere una consistencia similar a un gel. A modo de ejemplo también se conoce, por medio de la patente ES2221770B2, un procedimiento de preparación de otra composición obtenida a partir de un compuesto sanguíneo rico en factores de crecimiento y con propiedades biológicas muy beneficiosas, en este caso en forma líquida. Concretamente, se trata de un sobrenadante de un plasma sanguíneo rico en factores de crecimiento, obtenido a partir de la fase líquida sobrenadante que aparece tras provocar la coagulación y una posterior retracción de dicho plasma rico en factores de crecimiento. En esta patente se describen además diversos usos del sobrenadante, entre los cuales destaca su uso (favorecido por su consistencia líquida) como colirio para el tratamiento de enfermedades o dolencias oculares.

La presente invención tiene como objetivo ampliar los horizontes terapéuticos de aplicación del gel de plasma rico en factores de crecimiento, del sobrenadante de plasma rico en factores de crecimiento obtenidos tal como se define en las reivindicaciones 1 y 3.

Descripción breve de la invención

La invención tiene como objeto el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas mediante una composición obtenida a partir del centrifugado de sangre, la separación de plasma rico en plaquetas, la adición de cloruro cálcico al plasma rico en plaquetas causando con ello la liberación de factores de crecimiento por parte de plaquetas contenidas en el plasma y la coagulación del plasma hasta que adquiere una consistencia similar a un gel, o por medio del centrifugado de sangre, la separación de plasma rico en plaquetas, la coagulación y subsiguiente retracción de dicho plasma rico en plaquetas y la obtención de un sobrenadante de dicha retracción. La composición está configurada para su uso como sustancia terapéutica de aplicación intranasal para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. El medio de aplicación de la composición o de la sustancia terapéutica, de acuerdo con la invención, para hacer llegar la misma al sistema nervioso central de forma eficaz desde el punto de vista del tratamiento y al mismo tiempo de forma segura para el paciente, es la aplicación por vía intranasal. La vía intranasal es una vía de acceso al sistema nervioso central no invasiva, que permite una notable facilidad de aplicación de la composición o sustancia terapéutica y por tanto de realización del tratamiento, ya que al contrario que las vías invasivas no exige de inyecciones continuas u otros medios de aplicación traumáticos para el paciente ni produce efectos secundarios en el paciente. Ha de hacerse notar también que la vía intranasal es una vía no invasiva muy relevante desde el punto de vista del acceso al sistema nervioso central, ya que dicho acceso es imposible por otras vías no invasivas

debido a la existencia de diferentes barreras fisiológicas, entre las que destaca la barrera hematoencefálica.

Descripción breve de las figuras

Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:

- La Figura 1 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la formación de placas de beta-amiloide a los tres y seis meses en ratones transgénicos APP/PS1 tratados mediante un plasma rico en factores de crecimiento aplicado por vía intranasal.
- La Figura 2 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la cantidad de beta-amiloide en su forma de AB40 Y AB42 a los tres y seis meses en ratones transgénicos APP/PS1 tratados mediante un plasma rico en factores de crecimiento aplicado por vía intranasal.
- La Figura 3 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la astrogliosis a los seis meses en ratones transgénicos APP/PS1 tratados mediante un plasma rico en factores de crecimiento aplicado por vía intranasal.
- La Figura 4 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la neurogénesis a los seis meses en ratones transgénicos APP/PS1 tratados mediante un plasma rico en factores de crecimiento aplicado por vía intranasal.
- La Figura 5 muestra resultados de dos tests de comportamiento en ratones transgénicos APP/PS1 tratados mediante un plasma rico en factores de crecimiento aplicado por vía intranasal.

Descripción detallada de la invención

Existe una zona anatómica en la que es más que previsible puedan encontrarse efectos terapéuticos beneficiosos derivados del uso de composiciones obtenidas a partir de compuestos sanguíneos con factores de crecimiento. Se trata de uno de los más importantes de todos los sistemas que se encuentra en el cuerpo: el sistema nervioso central, encargado de recibir y procesar las sensaciones recogidas por los diferentes sentidos y de transmitir las órdenes de respuesta de forma precisa a los distintos efectores. Concretamente, las células que forman el sistema nervioso central se disponen de tal manera que dan lugar a dos formaciones muy características: la sustancia gris, constituida por los cuerpos neuronales, y la sustancia blanca, formada principalmente por las prolongaciones nerviosas (dendritas y axones), cuya función es conducir la información.

En el sistema nervioso central se producen algunas de las enfermedades que hoy en día presentan mayor prevalencia especialmente en individuos de edad avanzada como son las enfermedades neurodegenerativas. Se conoce como enfermedad neurodegenerativa al tipo de enfermedades que agrupa a un género de desórdenes cognitivos, tales como, enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, de Creutzfeldt-Jakob o esclerosis múltiple entre otras. Estos trastornos cognitivos son causados por un aumento en los procesos de muerte celular, que reduce en gran medida el número de neuronas y genera cambios en la conducta y una degeneración global progresiva que provoca la muerte del paciente. Además, en muchas de estas patologías existen alteraciones del flujo sanguíneo a nivel cerebral que producen lesiones más o menos importantes según la localización y el tamaño de la zona afectada y del tiempo durante el cual el paciente permanece sin el tratamiento adecuado.

En la actualidad, la administración de agentes tróficos (sustancias que influyen en el crecimiento axónico y en la formación de sinapsis, y que favorecen la supervivencia de las células del sistema nervioso central), antiapoptóticos (sustancias que reducen la muerte celular) y/o inductores de la neovascularización (sustancias que promuevan la formación de vasos sanguíneos) se contempla como un tratamiento esperanzador para algunas de estas enfermedades, no por su capacidad de curar las mismas, sino por su importancia como herramientas terapéuticas que retrasen la evolución de las patologías y con ello, los numerosos cambios cognitivos que producen.

No obstante, la administración de sustancias a nivel del sistema nervioso central entraña importantes dificultades galénicas y tecnológicas debidas a las particularidades anatómicas de esta área y al difícil acceso de sustancias a este nivel. Hay que tener en cuenta que el sistema nervioso central, que está constituido por el encéfalo y la médula espinal, está fuertemente aislado del resto del organismo y del medio externo por tres membranas: duramadre (membrana externa), aracnoides (membrana intermedia), piamadre (membrana interna) denominadas genéricamente meninges. Además, el encéfalo y la médula espinal están protegidos por envolturas óseas, que son el cráneo y la columna vertebral respectivamente. Las cavidades de estos órganos (ventrículos en el caso del encéfalo y conducto

ependimario en el caso de la médula espinal) están llenas de un líquido incoloro y transparente, que recibe el nombre de líquido cefalorraquídeo. Las funciones del líquido cefalorraquídeo son muy variadas: sirve como medio de intercambio de determinadas sustancias, como sistema de eliminación de productos residuales, para mantener el equilibrio iónico adecuado y como sistema amortiguador mecánico.

La invención propone, con el fin de superar las necesidades actuales de tratar enfermedades del sistema nervioso central de forma viable, el tratamiento de dichas enfermedades (o incluso de otras patologías aplicables) mediante una composición obtenida del centrifugado de sangre, la separación de plasma rico en plaquetas, la adición de cloruro cálcico al plasma rico en plaquetas causando con ello la liberación de factores de crecimiento por parte de plaquetas contenidas en el plasma y la coagulación del plasma hasta que adquiere una consistencia similar a un gel, o por medio del centrifugado de sangre, la separación de plasma rico en plaquetas, la coagulación y subsiguiente retracción de dicho plasma rico en plaquetas y la obtención de un sobrenadante de dicha retracción. La composición está configurada para su uso como sustancia terapéutica de aplicación intranasal para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. El medio de aplicación de la composición, de acuerdo con la invención, para hacer llegar la misma al sistema nervioso central de forma eficaz desde el punto de vista del tratamiento y al mismo tiempo de forma segura para el paciente, es la aplicación por vía intranasal. La vía intranasal es una vía de acceso al sistema nervioso central no invasiva, que permite una notable facilidad de aplicación de la composición o de la sustancia terapéutica y de realización del tratamiento, ya que al contrario que las vías invasivas no exige de inyecciones continuas u otros medios de aplicación traumáticos para el paciente ni produce efectos secundarios en el paciente. Ha de hacerse notar también que la vía intranasal es una vía no invasiva muy relevante desde el punto de vista del acceso al sistema nervioso central, ya que dicho acceso es imposible por otras vías no invasivas debido a la existencia de diferentes barreras fisiológicas. Además, la administración intranasal es sencilla, segura y fácil de emplear, lo que permitirá que el paciente se suministre la medicación sin la necesidad de ayuda por parte de otras personas.

La aplicación de la composición sanguínea con factores de crecimiento por vía intranasal permite la llegada de la composición sanguínea y sus agentes terapéuticos al sistema nervioso central y la consecución de sus efectos biológicos de la forma que se explica a continuación. Los nervios olfatorios y trigéminos, que inervan la cavidad nasal, proporcionan una conexión de la cavidad nasal directa con el sistema nervioso central. El trigémino no aporta ramas a la región olfatoria pero inerva el epitelio respiratorio y el vestíbulo de la cavidad nasal; además, establece una conexión con el sistema nervioso central, especialmente con la región caudal del cerebro, el tallo cerebral y la médula espinal, y transmite la información sensorial desde la cavidad nasal hasta estas regiones. Por lo tanto, estos condicionantes otorgan a la mucosa nasal unos atributos anatómicos y fisiológicos muy particulares, que facilitan introducir en el organismo medios terapéuticos que pueden alcanzar el sistema nervioso central después de la instilación nasal, y de esta forma eludir la barrera hematoencefálica.

En la región olfativa se pueden producir mecanismos de transporte intracelulares, extracelulares y perivasculares. La ruta intracelular de una sustancia hacia el sistema nervioso central se hace a través de la captación de dicha sustancia por las dendritas de las neuronas olfativas, por pinocitosis o por simple difusión, y posterior traslado por el nervio olfatorio. El mecanismo de transporte extracelular o paracelular facilita el paso de la sustancia entre las células del epitelio nasal y su rápida entrada en los canales perineurales (creados por las células olfativas envolventes que rodean a las ramas del nervio olfatorio), lo que permite a la sustancia alcanzar el líquido cefalorraquideo y el bulbo olfatorio. Desde el líquido cefalorraquideo, la sustancia se puede mezclar con el líquido intersticial presente en el cerebro, lo que facilita su distribución por todo este órgano; además, la sustancia puede entrar en los espacios perivasculares existentes en la mucosa nasal y en el tejido cerebral para distribuirse rápido en todo el sistema nervioso central.

La composición puede ser autóloga (donante y receptor es la misma persona) o heteróloga (donante y receptor son personas distintas) preparada según cualquier método de preparación aplicable. Los factores de crecimiento pueden encontrarse liberados o no. El sobrenadante o el gel podrán haber sido recientemente preparados, o bien podrán haberse encontrado preparados previamente y almacenados (por ejemplo mediante la técnica de tratamiento térmico, liofilización y posterior re-suspensión propuesta por la solicitud de patente ES2369945A1 a favor del propio solicitante).

A lo largo de los últimos 20 años se ha realizado un profundo estudio con el ánimo de determinar el conjunto de sustancias (proteínas, péptidos, factores de crecimiento, etc) presentes en composiciones sanguíneas. Hoy en día es sabido que el plasma y fundamentalmente las plaquetas presentan un importante cóctel de sustancias que incluyen agentes neurotróficos como el NGF o factor de crecimiento nervioso, sustancias angiogénicas o promotoras de la formación de vasos sanguíneos como el VEGF,

angiopoietinas, PDGF, EGF, IGF-I, etc. y agentes antiapoptóticos como el propio VEGF.

La composición puede contener o no componentes celulares hemáticos (plaquetas, eritrocitos y glóbulos blancos).

Por sustancia terapéutica se entiende la composición misma o bien una sustancia obtenida a partir de dicha composición con fines terapéuticos.

La naturaleza líquida del sobrenadante, su fluidez y propiedades osmóticas hacen que sea un preparado ideal para su administración por vía nasal.

A su vez, el uso de una composición de tipo gel permite la cesión de los factores de crecimiento durante varias semanas lo que a su vez permite reducir el número de veces que el paciente debe administrarse la composición.

A continuación se describen resultados experimentales que demuestran la efectividad del tratamiento de enfermedades neurodegenerativas por medio de la aplicación por vía intranasal de una composición según las reivindicaciones 1 o 3.

La Figura 1 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la formación de placas de beta-amiloide a los tres y seis meses en ratones transgénicos APP/PS1. Se ha medido concretamente la densidad de placas en animales tratados por vía intranasal con un Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), en comparación con un grupo de control formado por animales enfermos no tratados. El PRGF ha sido obtenido para estos experimentos mediante el método de preparación descrito en US6569204. La beta-amiloide (Aβ) es un péptido de 36 a 43 aminoácidos que se sintetiza a partir de la proteína precursora amiloide. Aunque es generalmente conocida por su relación con la enfermedad de Alzheimer, no se conoce todavía si es causa o efecto de la enfermedad. La beta-amiloide es el principal componente de las placas seniles (depósitos que se encuentran en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer). Un aumento en los niveles totales de Aβ o un aumento en la concentración tanto de Aβ40 y Aβ42 se relaciona completamente con la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Los datos de la Figura 1 corresponden tanto a la región del córtex (Cx) como al hipocampo (Hip), mostrándose también el área CA1 del hipocampo y el giro dentado (DG). Los resultados muestran con claridad como los animales que recibieron PRGF por vía intranasal presentan niveles significativamente menores de placas, independientemente de la localización y el tiempo de seguimiento.

La Figura 2 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la cantidad de beta-amiloide en su forma de AB40 Y AB42 a los tres y seis meses en ratones transgénicos APP/PS1 tratados con PRGF, en comparación con un grupo de control formado por animales enfermos no tratados. Los datos corresponden tanto a la región del córtex (Cx) como al hipocampo (Hip). Los resultados muestran con claridad como los animales que recibieron PRGF por vía intranasal presentan niveles significativamente menores de ambos tipos de beta-amiloide, responsables en parte del daño neuronal, independientemente de la localización y el tiempo de seguimiento.

La Figura 3 muestra resultados de estudios en los que se ha medido el grado de astrogliosis o crecimiento anormal de astrocitos debido a la destrucción de neuronas próximas en ratones transgénicos APP/PS1 tratados con PRGF, en comparación con un grupo de control formado por animales enfermos no tratados. Los astrocitos son las principales y más numerosas células gliales (células del sistema nervioso que sirven de soporte de las neuronas e intervienen activamente en el procesamiento cerebral de la información en el organismo). La presencia de astrogliosis es un indicativo de la toxicidad presente en el cerebro. En general, la presencia de placas de beta-amiloide aumentan los niveles de astrocitos reactivos o astrogliosis. Los datos corresponden tanto a la región del córtex (Cx) como al hipocampo (hip) y el giro dentado (DG). Los resultados muestran con claridad cómo los animales que recibieron PRGF por vía intranasal presentan niveles significativamente menores de astrocitos reactivos independientemente de la localización y el tiempo de seguimiento.

La Figura 4 muestra resultados de estudios en los que se ha medido la neurogénesis (la diferenciación de nuevas neuronas a partir de células precursoras) a los seis meses en ratones transgénicos APP/PS1 tratados con PRGF, en comparación con un grupo de control formado por animales enfermos no tratados. Los datos corresponden a la región del hipocampo (Hip). Los resultados muestran con claridad como los animales que recibieron PRGF por vía intranasal presentan una neurogénesis significativamente superior. Empleando diferentes tipos de tinciones (correspondientes al primer, segundo y tercer par de fotografías comparativas) puede observarse la presencia de un mayor número de células nuevas en las histologías pertenecientes al grupo tratado con PRGF. En concreto, con el fin

de determinar con exactitud el fenotipo celular de estas nuevas células se decidió realizar una doble inmunohistoquímica (BrdU/NeuN) con la cual es posible marcar no solo las células en división, por lo tanto de nueva creación, si no también específicamente si son neuronas, gracias al marcaje NeuN.

La Figura 5 muestra los resultados de dos tests de comportamiento que valoran la memoria a corto y medio plazo y otros síntomas asociados a la enfermedad de Alzheimer como la apatía. Los tests se han realizado sobre tres grupos de ratones transgénicos APP/PS1: un grupo de animales sanos, un grupo de control formado por animales enfermos (con Enfermedad de Alzheimer) no tratados y un grupo de animales con idéntica enfermedad pero tratados con PRGF por vía intranasal. Los datos reflejan que los ratones transgénicos APP/PS1 que recibieron PRGF por vía intranasal presentan valores de recuperación en los tests de comportamiento, reflejando una mejora significativa frente a los ratones enfermos no tratados.

Concretamente, en el primer test se procedió a situar a los animales en un laberinto con forma de T ("T-maze") donde se había cerrado inicialmente uno de los brazos laterales del laberinto y se dejó a los animales completar el otro brazo. Posteriormente, se introdujeron nuevamente los animales y se analizó en tiempo que necesitaron para acudir al brazo que conocían del experimento anterior. Los animales del grupo de control no recordaban bien lo realizado y mostraban apatía y miedo, lo que hizo que tardasen más tiempo en completar el experimento. En cambio, los animales enfermos que recibieron un tratamiento intranasal terminaron el experimento en un tiempo significativamente menor que los animales del grupo de control, es decir, enfermos no tratados.

Por otra parte, el segundo test o estudio de reconocimiento de objetos (cuyas siglas en inglés son "ORT") se basó en la exploración por parte del animal de una zona central perfectamente identificada dentro de un espacio de forma cuadrada. Típicamente, un animal enfermo muestra dificultades para explorar zonas nuevas, más aun cuando dichas zonas no están cerca de las paredes lo que hace que sienta temor a lo desconocido. En el ensayo se cuantificó el tiempo que los animales pasaban en la zona central delimitada y se comparó con el tiempo total de reconocimiento (mostrando la gráfica el ratio del primer tiempo y el segundo tiempo, de manera que un mayor ratio indica una mayor situación cognitiva). Se midieron los comportamientos de idénticos tres grupos de animales que en el ensayo anterior. Como puede observarse, los animales tratados con PRGF sufrieron una importante mejora en su comportamiento tanto a los tres como a los seis meses con respecto a los animales enfermos no tratados (grupo de control).

REIVINDICACIONES

1. Composición obtenida por medio del centrifugado de sangre, la separación de plasma rico en plaquetas y la adición de cloruro cálcico al plasma rico en plaquetas causando la liberación de factores de crecimiento por parte de plaquetas contenidas en el plasma y la coagulación del plasma hasta que adquiere una consistencia similar a un gel, para su uso como sustancia terapéutica de aplicación intranasal para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

2. Composición, para su uso según la reivindicación 1, donde la composición es autóloga a un receptor al cual se va a administrar la composición de forma intranasal.

3. Composición obtenida por medio del centrifugado de sangre, la separación de plasma rico en plaquetas, la coagulación y subsiguiente retracción de dicho plasma rico en plaquetas y la obtención de un sobrenadante de dicha retracción, para su uso como sustancia terapéutica de aplicación intranasal para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

4. Composición, para su uso según la reivindicación 3, donde la composición es autóloga a un receptor al cual se va a administrar la composición de forma intranasal.

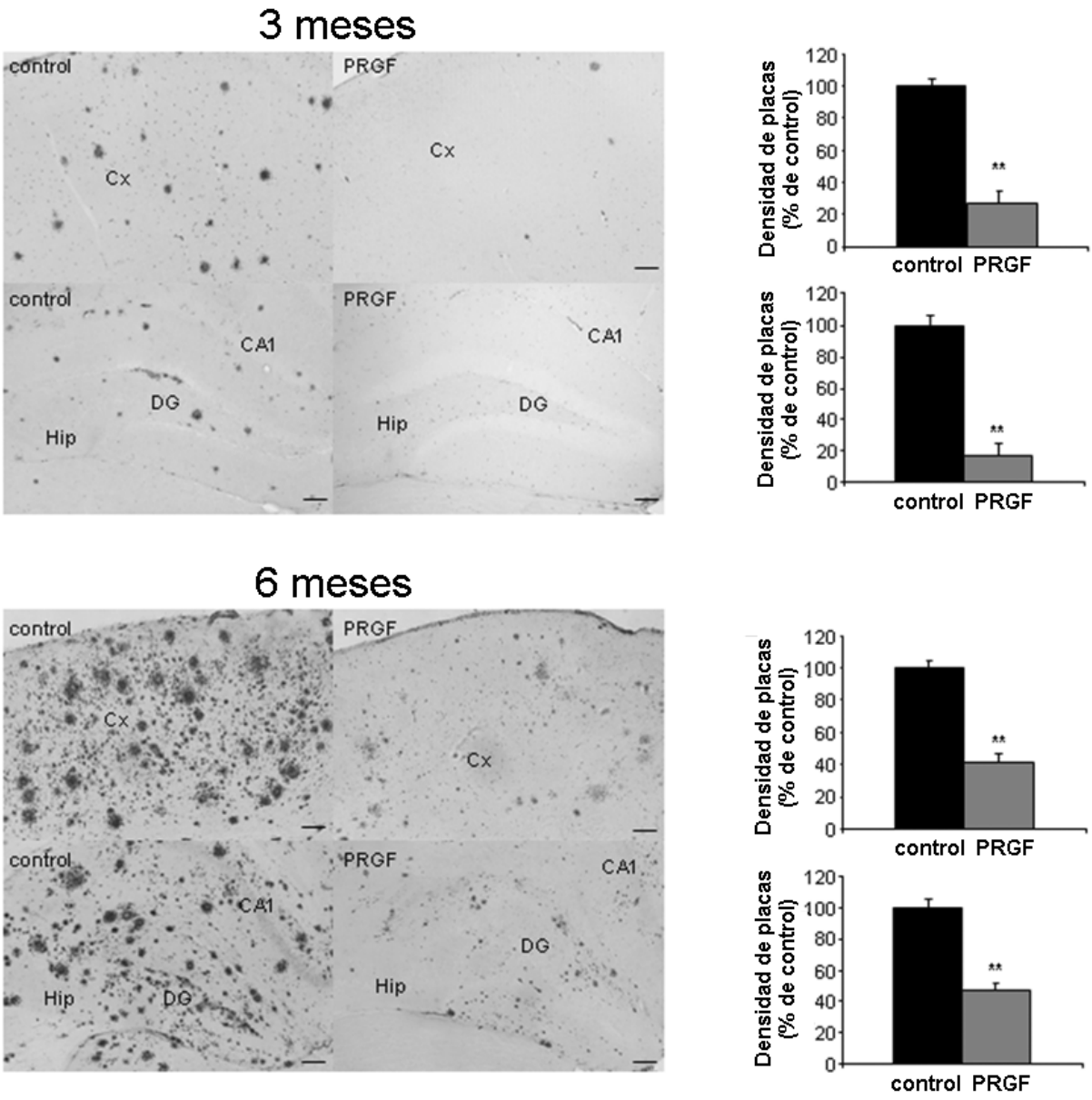
3 meses
control
PRGF
Cx
Cx
control
PRGF
CA1
CA1
DG
DG
Hip
Hip
Densidad de placas (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
**
control PRGF
Densidad de placas (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
**
control PRGF
6 meses
control
PRGF
Cx
Cx
control
PRGF
CA1
CA1
DG
Hip
Hip
DG
Densidad de placas (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
**
control PRGF
Densidad de placas (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
**
control PRGF

FIG.1

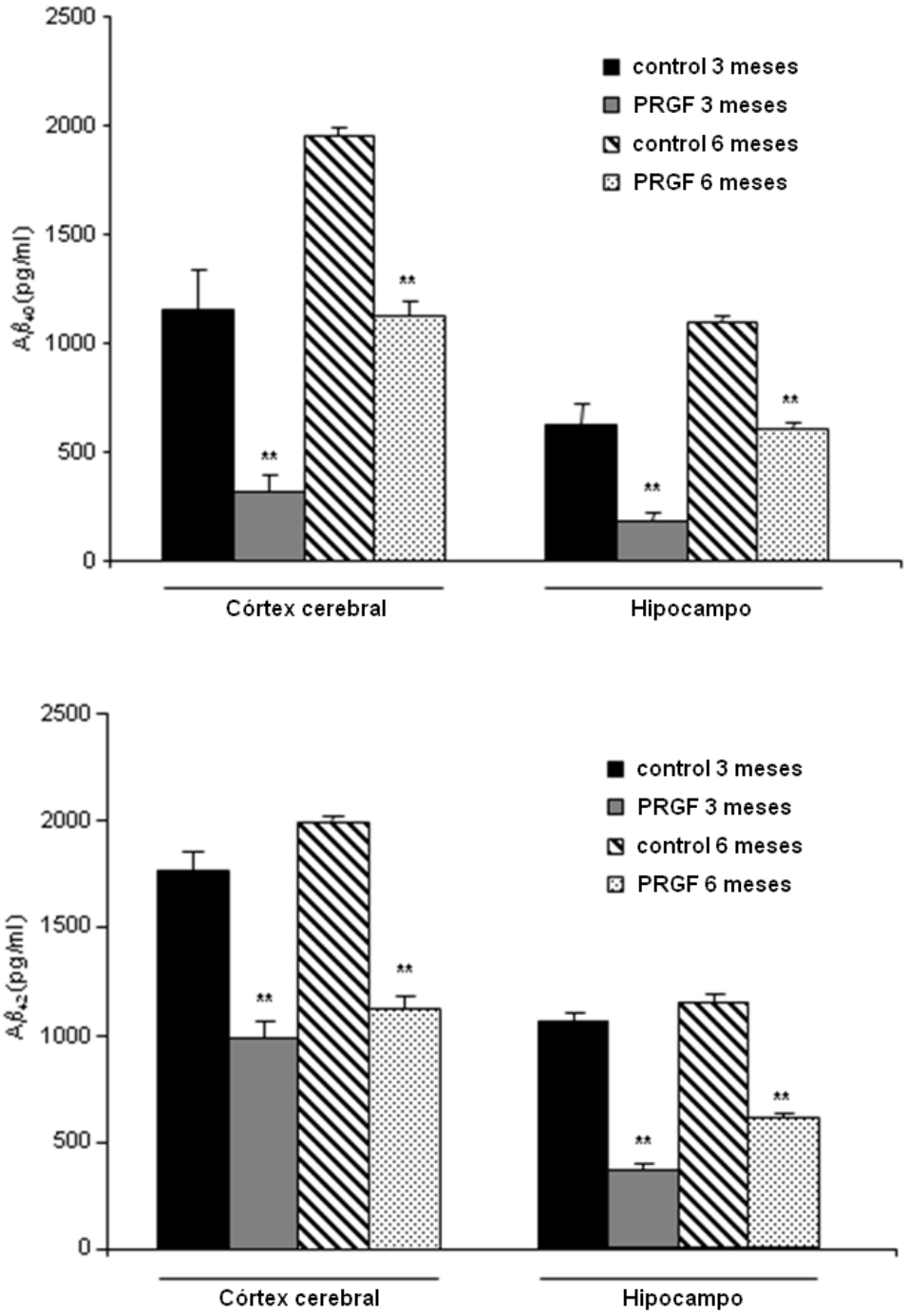
2500
2000
1500
1000
500
0
$A\beta_{40}$(pg/ml)
control 3 meses
PRGF 3 meses
control 6 meses
PRGF 6 meses
**
Córtex cerebral
Hipocampo
2500
2000
1500
1000
500
0
$A\beta_{42}$(pg/ml)
control 3 meses
PRGF 3 meses
control 6 meses
PRGF 6 meses
**
Córtex cerebral
Hipocampo

FIG.2

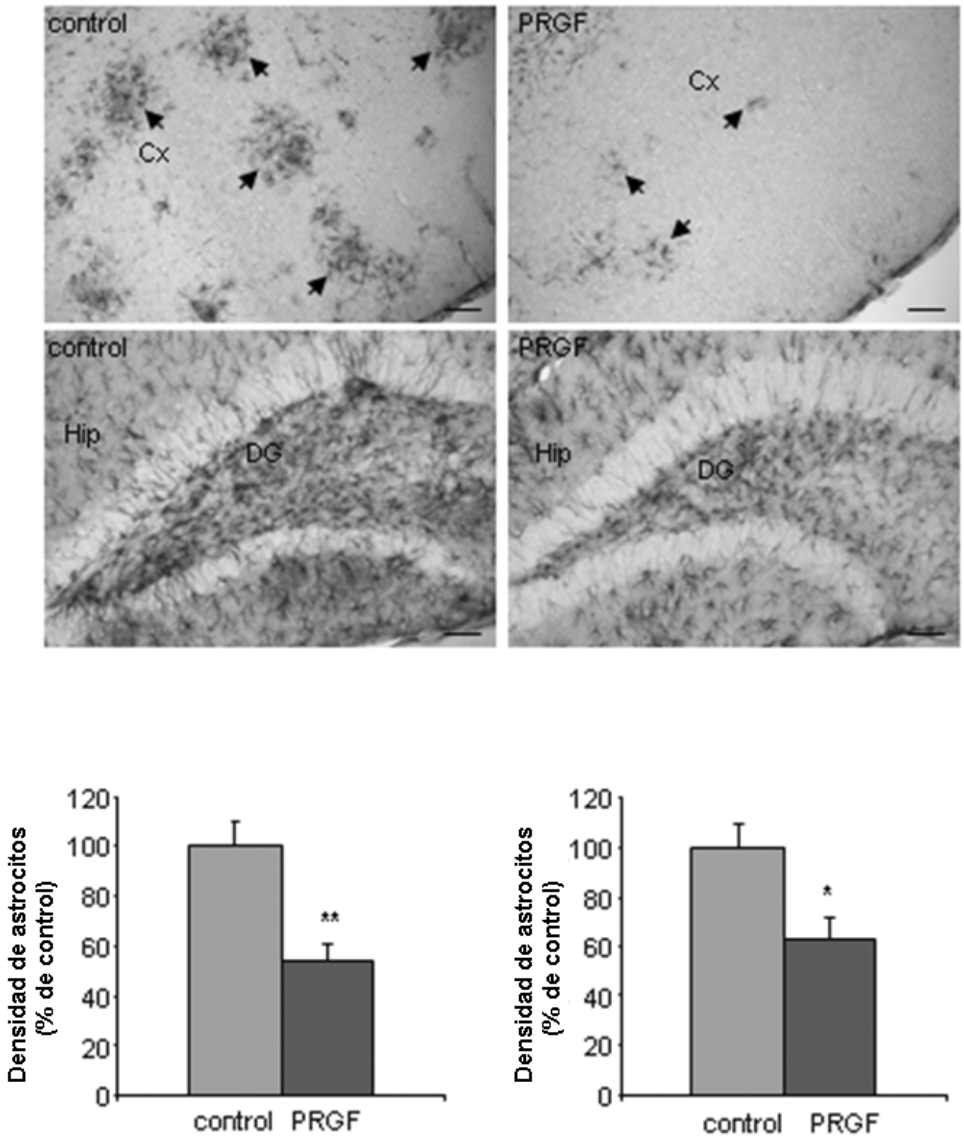
control
Cx
PRGF
Cx
control
Hip
DG
PRGF
Hip
DG
Densidad de astrocitos (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
**
control
PRGF
Densidad de astrocitos (% de control)
120
100
80
60
40
20
0
*
control
PRGF

FIG.3

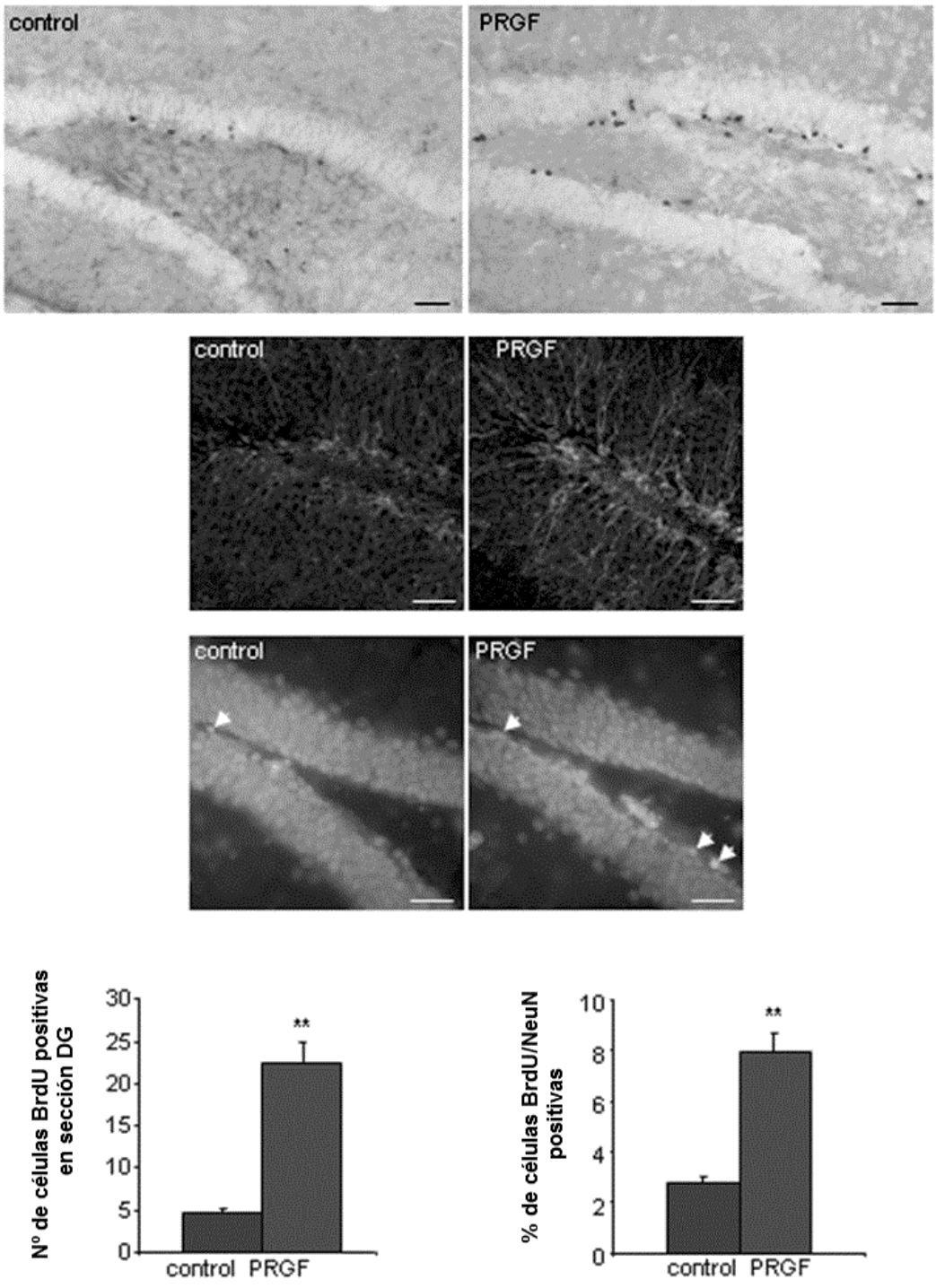
control
PRGF
control
PRGF
control
PRGF
Nº de células BrdU positivas en sección DG
30
25
20
15
10
5
0
**
control
PRGF
% de células BrdU/NeuN positivas
10
8
6
4
2
0
**
control
PRGF

FIG.4

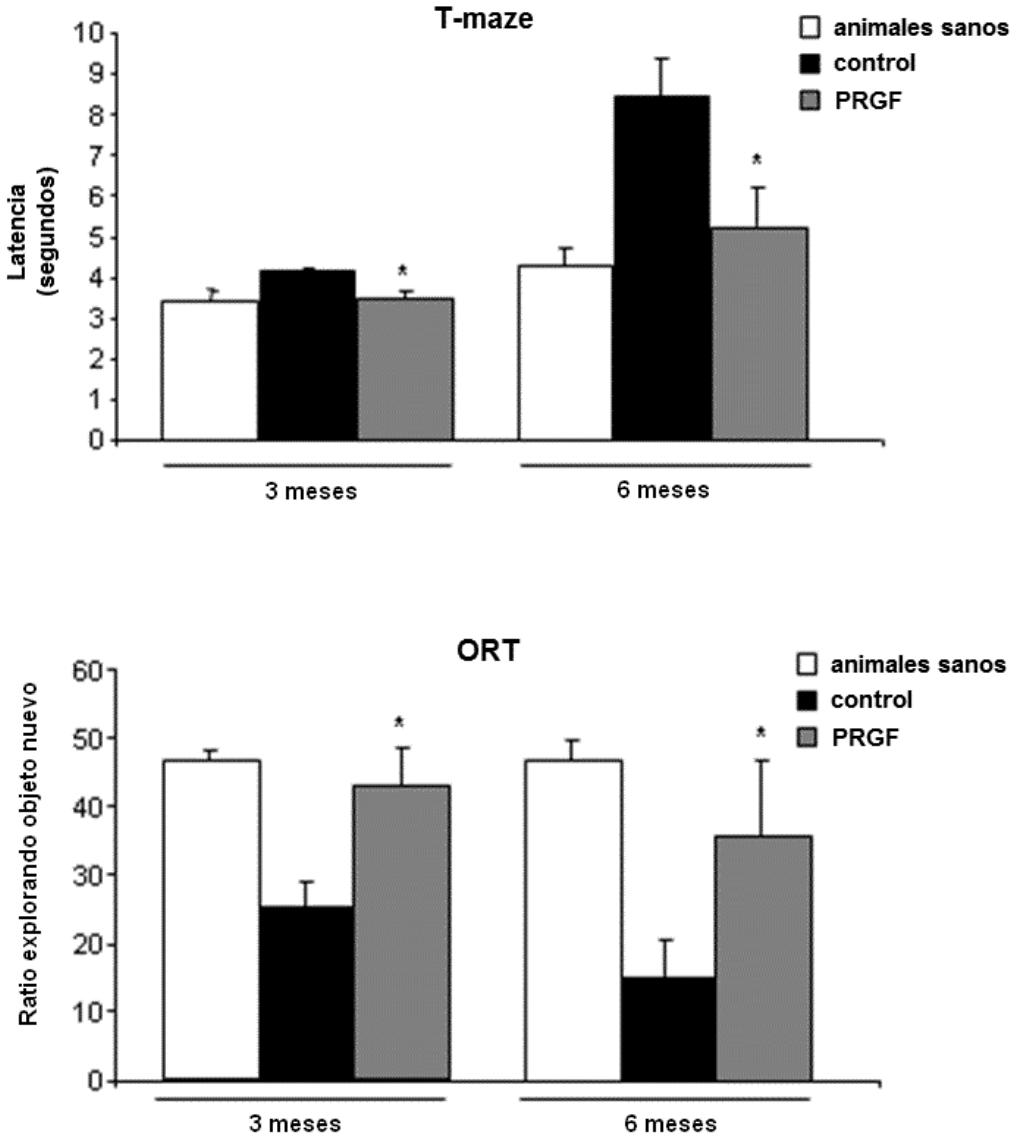
T-maze
animales sanos
control
PRGF
Latencia (segundos)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
3 meses
6 meses
ORT
animales sanos
control
PRGF
Ratio explorando objeto nuevo
60
50
40
30
20
10
0
*
*
3 meses
6 meses

FIG.5