

Título: Efecto Terapéutico del Uso Combinado del Factor de Crecimiento Epidérmico y el Péptido-6 Liberador de Hormona de Crecimiento en un Modelo de Patología Axonal.

Autores: Dra. Diana García del Barco Herrera^{1*} (diana.garcia@cigb.edu.cu);

Dr. Héctor Pérez-Saad²; Valia Rodríguez³; Javier Marín³; Viviana Falcón¹; Jorge Martín¹; Danay Cibrian¹; Jorge Berlanga¹.

Centro de procedencia:¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, División Farmacéuticos, Dirección de Investigaciones Biomédicas; ²Instituto de Neurología y Neurocirugía; ³Centro de Neurociencias ; *Investigador responsable del tema de Neuroprotección.

Premio de la instancia Nacional del concurso.

Introducción:

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad del sistema nervioso central caracterizada por pérdida irreversible de motoneuronas espinales, para la cual no existe tratamiento efectivo, y los pacientes evolucionan rápidamente hacia la muerte en pocos años (1). El factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el péptido-6 liberador de hormona del crecimiento (GHRP-6) han mostrado una variedad de propiedades fisiológicas y farmacológicas en diferentes contextos clínicos y experimentales. El EGF protege a las neuronas y a otras células del proceso de apoptosis (2;3) y contra la excitotoxicidad mediada por ácido glutámico (4). El GHRP-6 induce la expresión del factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina (IGF-1) en diferentes áreas del sistema nervioso (5). Se ha demostrado clínica y experimentalmente el efecto beneficioso que el IGF-1 produce tanto en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) como en modelos animales de esta patología (6;7). Por tanto, los efectos citoprotectores del EGF y del GHRP-6 parecen estar relacionados con sus mecanismos moleculares pleiotrópicos y de supervivencia, los cuales hacen que diferentes tipos celulares sean más tolerantes frente a un amplio espectro de insultos (8-10).

En desórdenes complejos del sistema nervioso, una estrategia terapéutica mediada por la combinación de agentes con diferentes mecanismos de acción en sus efectos protectores, está en concordancia con las nuevas tendencias que defienden el criterio de que tales tipos de enfermedades demandan abordajes terapéuticos complejos, en

los cuales la citoprotección juega un papel reconocido tanto en los eventos preventivos como en los eventos regenerativo (11;12). Un ejemplo de dichos desórdenes es la ELA. Dadas las características devastadoras de esta patología, es realmente justificable y mandatorio la evaluación de nuevas intervenciones terapéuticas.

Previamente ha sido descrito que la administración repetida del compuesto gamma-dicetónico 1,2 diacetilbenceno (1,2-DAB) en ratones induce síntomas de neuropatía axonal proximal reproduciendo algunas de las principales características fisiopatológicas de la ELA (13;14). El efecto final de la acción del 1,2 DAB es la inducción del fenómeno de estrangulación axonal mediante la formación de agregados de proteínas entre los microfilamentos y los microtúbulos, alterando su arquitectura normal de asociación, y afectando, por consiguiente, el transporte axonal (15). Además, se ha sugerido que el efecto neurotóxico del 1,2 DAB depende de la generación de especies reactivas de oxígeno (16); de hecho, tanto la estrangulación axonal como el daño oxidativo son importantes signos distintivos en la fisiopatología de la ELA (17). En este sentido, también la patología axonal inducida con 1,2 DAB sustenta la teoría tóxica de la ELA (18). Por todo lo anterior, la neurotoxicidad por 1,2 DAB brinda un modelo animal apropiado para la evaluación de nuevos candidatos farmacológicos dirigidos al tratamiento de la ELA.

Con estos antecedentes, se decidió evaluar los efectos del EGF y del GHRP-6, solos o en combinación, en la neuropatía inducida por 1,2 DAB.

Materiales y Métodos:

Animales de experimentación y generación del modelo de patología axonal por intoxicación con 1,2 diacetilbenceno (1,2 DAB)

Se emplearon ratones hembras de la cepa C57BL/6 (19 ± 1 g de peso corporal), procedentes del CENPALAB (Habana, Cuba). El 1,2 DAB (Fluka) se preparó disolviéndolo en una solución de acetona al 2% en solución salina (vehículo) (14). Los animales se inyectaron con dosis diarias de 30 mg/kg de 1,2 DAB durante 45 días. Un grupo control sano recibió solo la inyección de solución de acetona al 2% en solución salina.

Después de la última inyección de 1,2 DAB (día 45) los animales se dividieron en cuatro grupos experimentales de 15 animales cada uno atendiendo al tratamiento que recibiría: EGF (200 μ g/kg), GHRP₆ (660 μ g/kg), EGF+GHRP₆ (200 μ g/kg y 660 μ g/kg), y solución

salina (placebo). Luego de finalizada la administración de 1,2 DAB los tratamientos se aplicaron diariamente por vía intraperitoneal durante un período de 20 días.

A lo largo del período de intoxicación por 1,2 DAB y durante el tiempo de tratamiento los animales se sometieron a las siguientes pruebas sensoriales y motoras, con el objetivo de estimar cambios en la fuerza muscular y el equilibrio: suspensión en rejilla, barra horizontal o trapecio, y campo abierto (19;20). También se analizó el patrón de marcha (21). Los experimentos electrofisiológicos se realizaron empleando un equipo *Neuronic-5* (Neuronic S.A. Cuba). Los animales se anestesiaron con 130 mg/kg de ketamina (Liorad, Cuba) y 3 mg/kg de diazepam (Imefa, Cuba). Se registró el potencial de acción muscular complejo (PAMC) empleando un registro monopolar. Los electrodos de registro positivo y de referencia se insertaron en los músculos de la pierna, y en la piel de la membrana interdigital como sitio eléctricamente indiferente. Para la estimulación los electrodos se colocaron cerca de las vértebras, por debajo de la última costilla (S1). La estimulación eléctrica consistió en pasar un pulso cuadrado de 0,1ms de duración, y de 30 mA de intensidad. Se midieron la latencia (l), duración (d) y la amplitud (a) del PAMC. Se analizó la expresión matemática a/ld que se denominó índice del PAMC integrado (IPAMCI).

Resultados:

El tratamiento con el 1,2 DAB produjo un deterioro de la fuerza muscular, una alteración en el patrón de marcha, pérdida del reflejo de extensión y cambios electrofisiológicos dados por aumento de la latencia de inicio, la duración y una reducción de la amplitud del PAMC (Fig. 1)

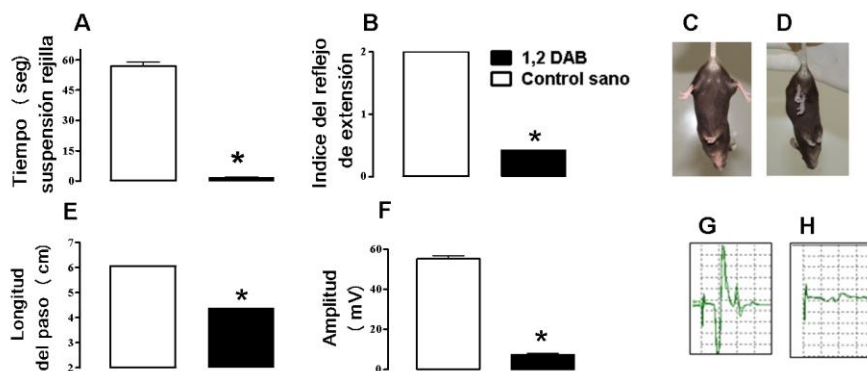


Figura 1. **A:** Evaluación de la fuerza muscular en animales enfermos por 1,2 DAB (n=60) y en controles sanos (n=10), prueba de suspensión en rejilla. Prueba t de Student. **B:** Escala del reflejo de extensión. Prueba U de Mann-Whitney. **C y D:** Postura típica de un animal control sano (C) y de un animal tratado con 1,2 DAB (D). **E:** Longitud del paso. Prueba Prueba U de Mann-

Whitney. **F** Amplitud del PAMC. Prueba t de Student.. Los trazados representan los registros del PAMC proximal de animales sanos (G) y enfermos (H). Los asteriscos indican diferencias significativas.

Los tratamientos con EGF o con GHRP₆ por separado no fueron efectivos en la recuperación del índice del potencial de acción muscular complejo integrado (IPAMCI). Sin embargo, la combinación EGF+GHRP₆ produjo un aumento del IPAMCI con respecto al grupo placebo a los 20 días después del tratamiento. Un análisis de regresión confirmó este resultado. El aumento del IPAMCI fue apreciable, además, por simple inspección de la morfología del PAMC (Fig. 2).

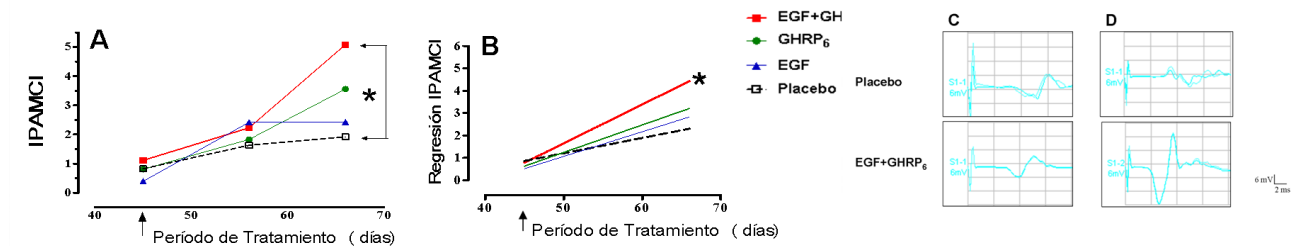


Figura 2. **A:** Efectos del EGF, GHRP₆, y la combinación EGF+GHRP₆ en la recuperación del IPAMCI. La flecha indica el último día de administración del 1,2 DAB. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Dunn. **B:** Análisis por regresión lineal de la evolución en el tiempo del IPAMCI, durante el tratamiento con EGF, GHRP₆, EGF+GHRP₆ y solución salina (0.9% NaCl) como placebo. Los asteriscos indican diferencia respecto al placebo. Registros representativos del PAMC antes (**C**) y después (**D**) de 21 días de tratamiento con placebo y EGF+GHRP₆.

Los estudios clínico-conductuales demostraron una mejoría en la fuerza muscular y en el patrón de la marcha solo en los animales tratados con la combinación EGF+GHRP₆. La longitud del paso fue el único de los parámetros del patrón de marcha que se recuperó con el tratamiento del EGF (Fig. 3 A-D)

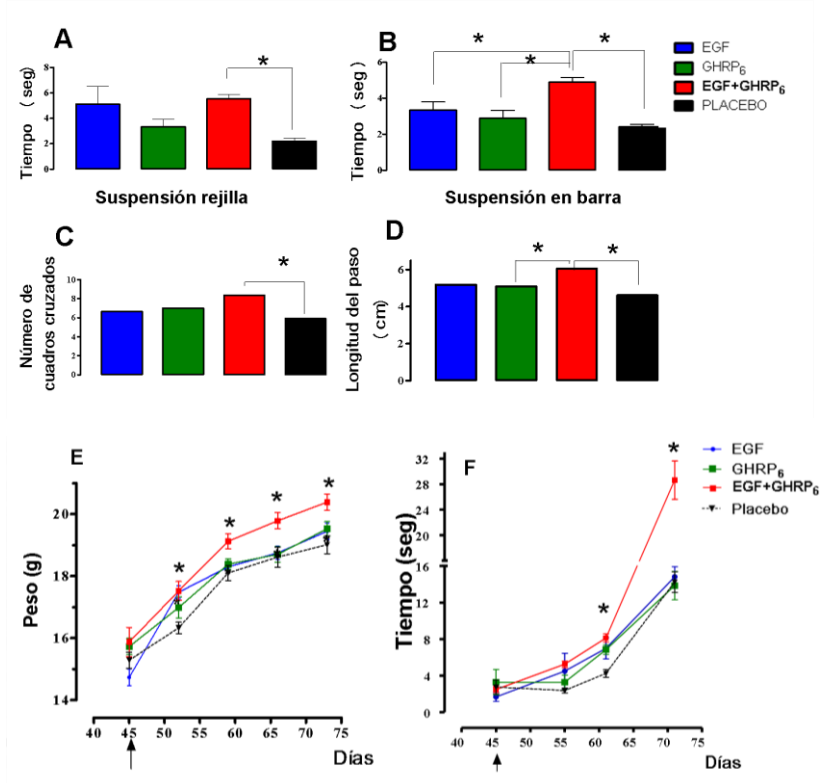


Figura 3. Evaluación clínico-conductual después de 10 días de tratamiento con EGF, GHRP₆, EGF+GHRP₆ y placebo. **A:** Prueba de suspensión en rejilla, **B:** Prueba de suspensión en barra, **C:** Actividad exploratoria en campo abierto y **D:** Longitud del paso. Prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnet (A y B) y Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn (C y D). Efecto de los tratamientos con EGF, GHRP₆, la combinación EGF+GHRP₆, y placebo, sobre el peso corporal (**E**), y sobre la fuerza muscular (**F**) durante el período de tratamiento. La flecha señala el inicio de los tratamientos. Prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnet. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al placebo.

La terapia combinada EGF+GHRP₆ produjo un incremento sostenido del peso y una recuperación de la fuerza muscular, evidenciada como tiempo de permanencia en rejilla a lo largo del periodo de tratamiento. Este efecto no se produjo con los péptidos independientes (Fig. 3 E y F).

Discusión:

El modelo de axonopatía inducida con 1,2 DAB reprodujo elementos clínicos y electrofisiológico y ultraestructurales característicos de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Adicionalmente, los resultados de estudios proteómicos demuestran que el 1,2 DAB

produce alteraciones en las proteínas del citoesqueleto, en proteínas que controlan los mecanismos redox y de plegamiento de proteínas de manera similar a lo que ocurre de en dicha enfermedad (13;22). El modelo de axonopatía inducida con 1,2 DAB puede ser considerado como un modelo etiopatogénico de Esclerosis Lateral Amiotrófica y ser utilizado como herramienta en la evaluación de estrategias terapéuticas.

Solo la administración combinada de EGF+ GHRP₆ resultó efectiva para la recuperación de los animales enfermos. Esto se demostró a través de parámetros clínicos, conductuales y electrofisiológicos.

En los estudios electrofisiológicos se demostró que el efecto de la terapia con EGF+GHRP₆ mejoró la recuperación del índice del PAMC (IPAMCI). Las diferencias en la efectividad entre el tratamiento con los péptidos independientes y el tratamiento con la combinación sugieren un sinergismo de potenciación. De acuerdo con principios farmacológicos bien establecidos, este tipo de sinergismo se manifiesta cuando los efectos de la terapia combinada exceden significativamente a la suma de los efectos de los componentes individuales. El sinergismo de potenciación usualmente ocurre cuando varios mecanismos moleculares convergen en un efecto celular común (23;24). Considerando los mecanismos de acción de cada componente, éste parece ser el caso de la terapia combinada EGF+GHRP₆. Indudablemente, la acción concertada de ambos péptidos crea un contexto homeostático favorable para proteger células del tejido nervioso.

Como la toxicidad inducida por glutamato es uno de los elementos patogénicos más relevantes en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la acción del EGF al incrementar la recaptación del glutamato por los astrocitos, contribuye a reducir su toxicidad (4;25). El GHRP₆ tiene una acción directa en la prevención y la reversión de la muerte inducida por glutamato (26). Otros de los efectos neuroprotectores del GHRP₆ están mediados por la inducción de proteínas con funciones neuroprotectoras (27): la hormona de crecimiento (28) y el IGF-1 en algunas regiones del sistema nervioso central (26;29). Esto representa una ventaja importante ya que en Esclerosis Lateral Amiotrófica se ha descrito un incremento significativo de las proteínas que secuestran al IGF-1 (IGFBP) (6;30), las cuales se unen tanto al IGF-1 constitutivo como al exógeno y aceleran su aclaramiento hepático, evitando que el IGF-1 alcance sus dianas en el cerebro.

Conclusiones:

La racionalidad del enfoque terapéutico propuesto en este trabajo se ratifica en artículos recientes, en los cuales se constata que en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes

de Esclerosis Lateral Amiotrófica el EGF se encuentra reducido (31), existe una correlación negativa entre los niveles de IGF-1 en sangre y la severidad de de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (32) y se reduce la secreción de hormona de crecimiento (33;34). Si esas alteraciones se consideran elementos patogénicos, la administración combinada del EGF (disminuido en Esclerosis Lateral Amiotrófica) y del GHRP₆, (que induce IGF-1 y hormona de crecimiento, también deficitarias en Esclerosis Lateral Amiotrófica), pudiera contribuir a restablecer estos elementos.

Referencias bibliográficas:

(1) Beghi E, Mennini T, Bendotti C, Bigini P, Logroscino G, Chio A, et al. The heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a possible explanation of treatment failure. *Curr Med Chem* 2007;14(30):3185-200.

(2) Satoh T, Enokido Y, Kubo T, Yamada M, Hatanaka H. Oxygen toxicity induces apoptosis in neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1998 Dec;18(6):649-66.

(3) Niidome T, Morimoto N, Iijima S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation. *Eur J Pharmacol* 2006 Oct 24;548(1-3):1-8.

(4) Casper D, Blum M. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor protect dopaminergic neurons from glutamate toxicity in culture. *J Neurochem* 1995 Sep;65(3):1016-26.

(5) Frago LM, Paneda C, Argente J, Chowen JA. Growth hormone-releasing peptide-6 increases insulin-like growth factor-I mRNA levels and activates Akt in RCA-6 cells as a model of neuropeptide Y neurones. *J Neuroendocrinol* 2005 Nov;17(11):701-10.

(6) Hosback S, Hardiman O, Nolan CM, Doyle MA, Gorman G, Lynch C, et al. Circulating insulin-like growth factors and related binding proteins are selectively altered in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *Growth Horm IGF Res* 2007 Dec;17(6):472-9.

(7) Lepore AC, Haenggeli C, Gasmi M, Bishop KM, Bartus RT, Maragakis NJ, et al. Intraparenchymal spinal cord delivery of adeno-associated virus IGF-1 is protective in the SOD1G93A model of ALS. *Brain Res* 2007 Dec 14;1185:256-65.

(8) Berlanga J, Caballero ME, Ramirez D, Torres A, Valenzuela C, Lodos J, et al. Epidermal growth factor protects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Clin Sci (Lond)* 1998 Mar;94(3):219-23.

(9) Berlanga J, Cibrian D, Guevara L, Dominguez H, Alba JS, Seralena A, et al. Growth-hormone-releasing peptide 6 (GHRP6) prevents oxidant cytotoxicity and reduces myocardial necrosis in a model of acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2007 Feb;112(4):241-50.

(10) Cibrian D, Ajamieh H, Berlanga J, Leon OS, Alba JS, Kim MJ, et al. Use of growth-hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) for the prevention of multiple organ failure. *Clin Sci (Lond)* 2006 May;110(5):563-73.

(11) Kriz J, Gowing G, Julien JP. Efficient three-drug cocktail for disease induced by mutant superoxide dismutase. *Ann Neurol* 2003 Apr;53(4):429-36.

(12) Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, Steiger HJ, Schmid-Elsaesser R. Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen. *Stroke* 2003 Jun;34(6):1526-32.

(13) Tshala-Katumbay D, Desjardins P, Sabri M, Butterworth R, Spencer P. New insights into mechanisms of gamma-diketone-induced axonopathy. *Neurochem Res* 2009 Nov;34(11):1919-23.

(14) Tshala-Katumbay DD, Palmer VS, Kayton RJ, Sabri MI, Spencer PS. A new murine model of giant proximal axonopathy. *Acta Neuropathol* 2005 Apr;109(4):405-10.

(15) Sabri MI, Hashemi SB, Lasarev MR, Spencer PS. Axonopathy-inducing 1,2-diacetylbenzene forms adducts with motor and cytoskeletal proteins required for axonal transport. *Neurochem Res* 2007 Dec;32(12):2152-9.

(16) Kim MK, Kim KS, Chung JH, Kim JH, Kim JR, Chung HY, et al. Environmental metabolite, 1,2-diacetylbenzene, produces cytotoxicity through ROS generation in HUVEC cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007 Aug;70(15-16):1336-43.

(17) Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009 Jan;65 Suppl 1:S3-S9.

(18) Shaw CA, Hoglinger GU. Neurodegenerative diseases: neurotoxins as sufficient etiologic agents? *Neuromolecular Med* 2008;10(1):1-9.

(19) Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973 May;21(2):205-35.

(20) Tesseur I, Van DJ, Bruynseels K, Bronfman F, Sciot R, Van LA, et al. Prominent axonopathy and disruption of axonal transport in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 in neurons of brain and spinal cord. *Am J Pathol* 2000 Nov;157(5):1495-510.

(21) Jaworski DM, Soloway P, Caterina J, Falls WA. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2)-deficient mice display motor deficits. *J Neurobiol* 2006 Jan;66(1):82-94.

(22) Tshala-Katumbay D, Monterroso V, Kayton R, Lasarev M, Sabri M, Spencer P. Probing mechanisms of axonopathy. Part II: Protein targets of 2,5-hexanedione, the neurotoxic metabolite of the aliphatic solvent n-hexane. *Toxicol Sci* 2009 Feb;107(2):482-9.

(23) De la Cruz JP, Sanchez de la CF. Does the association dipyridamole-aspirin only act by a functional synergism? *Gen Pharmacol* 1991;22(2):271-4.

(24) Finkel DM, Capmourteres EM. Combination of nondepolarizing muscle relaxants: synergism of potentiation. *Rev argent anestesiol* 1999;57(3):145-54.

(25) Hicks D, Heidinger V, Mohand-Said S, Sahel J, Dreyfus H. Growth factors and gangliosides as neuroprotective agents in excitotoxicity and ischemia. *Gen Pharmacol* 1998 Mar;30(3):265-73.

(26) Delgado-Rubin de Celix A., Chowen J.A., Argente J., Frago L.M. Growth hormone releasing peptide-6 acts as a survival factor in glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurochem* 2006 Nov;99(3):839-49.

(27) Isgaard J, Aberg D, Nilsson M. Protective and regenerative effects of the GH/IGF-I axis on the brain. *Minerva Endocrinol* 2007 Jun;32(2):103-13.

(28) Micic D, Casabiell X, Gualillo O, Pombo M, Dieguez C, Casanueva FF. Growth hormone secretagogues: the clinical future. *Horm Res* 1999;51 Suppl 3:29-33.

(29) Frago LM, Paneda C, Dickson SL, Hewson AK, Argente J, Chowen JA. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology* 2002 Oct;143(10):4113-22.

(30) Torres-Aleman I, Barrios V, Berciano J. The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis. *Neurology* 1998 Mar;50(3):772-6.

(31) Cieslak D, Szulc-Kuberska J, Stepień H, Klimek A. Epidermal growth factor in human cerebrospinal fluid: reduced levels in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 1986 Nov;233(6):376-7.

(32) Corbo M, Lunetta C, Magni P, Dozio E, Ruscica M, Adobbati L, et al. Free insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF-binding proteins-2 and -3 in serum and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2010 Mar;17(3):398-404.

(33) Morselli LL, Bongioanni P, Genovesi M, Licitra R, Rossi B, Murri L, et al. Growth hormone secretion is impaired in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006 Sep;65(3):385-8.

(34) Pellecchia MT, Pivonello R, Monsurro MR, Trojsi F, Longo K, Piccirillo G, et al. The GH-IGF system in amyotrophic lateral sclerosis: correlations between pituitary GH secretion capacity, insulin-like growth factors and clinical features. *Eur J Neurol* 2010 May;17(5):666-71.