

Título: Efecto terapéutico de la co-administración de EGF y GHRP-6 en un modelo murino de axonopatía proximal inducida por el 1,2-DAB.

Autores: Lic. Javier Marín Prida (javier.marin@ifal.uh.cu); Dra. Diana García del Barco Herrera y Dr. Héctor Pérez Saad.

Centro de procedencia: Universidad de La Habana e Instituto de Neurología y Neurocirugía

PALABRAS CLAVES: Esclerosis Lateral Amiotrófica, 1,2-Diacetilbenceno, Factor de Crecimiento Epidérmico, Péptido Liberador de la Hormona del Crecimiento tipo 6, Potencial de Acción Muscular Compuesto.

PREMIO CONCURSO NACIONAL DEL PREMIO ANUAL DE LA SALUD 2011.

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) se caracteriza por la pérdida generalizada de la actividad muscular debido a la degeneración de las motoneuronas (MNs) a todos los niveles del sistema motor.¹ Un 50% de los pacientes mueren dentro de los 3 años posteriores al diagnóstico, mientras que un 90% de ellos no sobrepasan los 5 años de supervivencia.² La enfermedad es de origen genético en un 10% de los casos (ELA Familiar: ELAf). El resto pertenece a la forma adquirida o esporádica (ELAe).³ De las nueve variedades genéticas descritas, las mutaciones en el *locus* de SOD1 agrupan un 20% de los casos de ELAf.⁴ La incidencia de ELA en Europa varía entre 1,5 y 2,5 / 100 000 habitantes / año,⁵ siendo superior que en Cuba, lo cual está correlacionado con una mayor mezcla étnica.⁶ La rápida progresión y las consecuencias devastadoras de la ELA representan un alto costo social y económico para el Sistema de Salud Pública y para la calidad de vida del paciente y su familia.

Desde el punto de vista terapéutico la ELA es un nicho vacío. El riluzol, único fármaco aprobado para uso clínico, ha demostrado efectos muy modestos en términos de alargar la sobrevida.^{7,8} Entre las razones que permiten explicar el fracaso en la traslación clínica está el uso de roedores transgénicos como modelos experimentales de ELA, que no representan la mayoría de los casos clínicos, como por ejemplo para SOD1 mutada,⁹ para las subunidades de los neurofilamentos (NFs),¹⁰ y para la Alsina-2.¹¹ La administración del 1,2-DAB en ratas Sprague-Dawley y en ratones C57BL/6 afecta principalmente el citoesqueleto axonal en los segmentos proximales, una característica patológica de la ELA.¹²⁻¹⁴ Estos cambios se caracterizan por la polimerización anormal de los NFs, que junto a otros eventos moleculares patológicos provoca la estrangulación del axón,^{12,15} de manera similar a lo descrito en pacientes de ELA.¹⁶ El 1,2-DAB también afecta la expresión de varias proteínas relacionadas con la patogénesis de la ELA.¹⁷⁻²⁰ Tales evidencias indican que este modelo puede ser utilizado para la evaluación preclínica de posibles candidatos terapéuticos para la ELA.²¹

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) participa en el crecimiento, la diferenciación, el mantenimiento y la reparación de varios tejidos, incluyendo el sistema nervioso (SN).^{22,23} Por su parte, el GHRP-6 pertenece a un grupo de compuestos sintéticos que inducen la liberación de la Hormona del Crecimiento en la

adenohipófisis.^{24,25} El GHRP-6 ejecuta diversas acciones en el SN, tales como la inducción del factor IGF-1 produciendo efectos neuroprotectores.^{26,27} El GHRP-6 inhibe la ejecución del programa apoptótico neuronal frente a daños neurotóxicos.^{28,29} Además, el IGF-1 media un amplio rango de acciones positivas en el SN, que lo ha convertido en un candidato atractivo para el tratamiento de la ELA.³⁰ Por otro lado, el EGF y la metencefalina, un péptido intestinal a partir del cual se deriva el GHRP-6,³¹ ejercen un papel bien documentado en el desarrollo y la fisiología del sistema nervioso central (SNC).³²⁻³⁴ Debido a sus potencialidades para favorecer la supervivencia, la diferenciación y la proliferación de tejidos neurales, es razonable hipotetizar que la combinación de estas moléculas pudiera tener efectos beneficiosos en desórdenes neurológicos complejos como es el caso de la ELA.

En el presente trabajo se profundiza en la caracterización del modelo de Axonopatía Proximal (AP) inducida por el 1,2-DAB en ratones C57BL/6 mediante el estudio simultáneo de variables clínico-conductuales y el análisis ultraestructural, y se describe por primera vez el perfil de los Potenciales de Acción Muscular Compuesto (PAMC) en tres segmentos del nervio ciático. Posteriormente, utilizando las variables clínico-conductuales y electrofisiológicas, se evalúa el efecto farmacológico de la combinación EGF-GHRP-6 en este modelo. De confirmarse los resultados obtenidos en futuros estudios clínicos, esta novedosa perspectiva terapéutica puede brindar nuevas esperanzas a los enfermos de tan desoladora enfermedad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La co-administración de los péptidos EGF y GHRP-6 en ratones con axonopatía proximal inducida por el 1,2-DAB promueve su recuperación clínico-conductual y de la conducción de los impulsos nerviosos.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de la co-administración de EGF y GHRP-6 en ratones con axonopatía proximal inducida por el 1,2-DAB.

Específicos

- Validar el modelo de axonopatía proximal inducida por el 1,2-DAB en ratones C57BL/6 mediante el análisis ultraestructural y el empleo de variables clínico-conductuales y electrofisiológicas.
- Evaluar el efecto de la combinación EGF-GHRP-6 a partir de variables clínico-conductuales y electrofisiológicas.

DISEÑO METODOLÓGICO

1- Animales

Se utilizaron 150 ratones hembras de la línea C57BL/6, entre 18 y 20 g al inicio del estudio, siguiendo normas internacionales.³⁵ Se realizaron dos series experimentales de acuerdo a la variante electrofisiológica, usando el registro bipolar y monopolar, respectivamente, y en cada una se llevó a cabo las mismas pruebas conductuales. Todas las soluciones fueron administradas por vía intraperitoneal.

2- Toxicidad inducida por el 1,2-DAB

Los animales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos: 60-70 ratones fueron inyectados diariamente (5 o 6 días a la semana) con la solución de 1,2-DAB (30 mg/kg peso) (Fluka, Alemania), preparada en acetona al 2 % (v:v) (Caledon, Canadá) en

solución salina estéril, y 10 ratones con solución de acetona al 2 % (grupo control). El período de toxicidad fue de 45 días.¹²

3- Tratamiento con GHRP-6, EGF y su combinación

Los ratones enfermos por el 1,2-DAB se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos (de 10 a 15 animales por grupo), y fueron inyectados diariamente (5-6 días a la semana) con EGF (200 µg/kg) (Heber Biotec, Cuba), GHRP-6 (660 µg/kg) (BCN Peptides, España), su combinación (manteniendo las dosis individuales) o con solución salina estéril, respectivamente. La duración del tratamiento fue de 20 días.

4- Pruebas conductuales

La batería de pruebas conductuales se realizó una vez a la semana a doble ciego por dos observadores entrenados. Se llevó a cabo durante la intoxicación con el 1,2-DAB, el tratamiento con los péptidos y una semana después de finalizar el esquema terapéutico. Todas las pruebas se realizaron en el horario de 9:00 am a 12:00 m.

4.1- Evaluación de la actividad motora y la fuerza muscular

El animal se suspendió por sus extremidades delanteras en una varilla de acero no resbaladiza de 2 mm de diámetro por 30 cm de longitud durante un minuto. Se midió el tiempo total de suspensión (reflejo prensil), y el tiempo en el cual subió alguna de sus extremidades traseras para sujetarse más firmemente a la varilla (capacidad de tracción).³⁶ Para la prueba de suspensión en rejilla (25 cm², dividida en cuadrículas de 16 mm²), se colocó al animal encima de la rejilla, la cual se volteó 180⁰ para mantenerlo suspendido durante 1 min. Se midió el tiempo total de suspensión.³⁷

4.2- Conducta exploratoria en campo abierto

El animal se colocó en el extremo superior izquierdo de una caja plástica de Plexiglás (30x30x15 cm) en cuyo fondo se colocó una hoja de papel blanco dividida en 9 cuadrantes iguales. Luego de 2 min de adaptación, el recorrido del animal durante 1 minuto se dibujó aparte y simultáneamente, se contó el número de empinamientos. Posteriormente se contó el número de veces que cada animal atravesó de un cuadrante a otro (modificado de Metz y Schwab, 2004).³⁸

4.3- Reflejo de extensión

El animal se suspendió por la cola y se calificó la postura de sus extremidades traseras de acuerdo a una escala cualitativa: 0 para ausencia de apertura, 1 para la apertura de una pata o de ambas patas con dedos cerrados, y 2 para la extensión total con dedos separados.³⁹

4.4- Patrón de la marcha

Al animal se le tiñó la superficie plantar de sus patas traseras con una tinta no tóxica y se colocó en uno de los extremos de un túnel de madera construido para este estudio (40x7x10 cm) en cuyo fondo se colocó un papel de cartulina.⁴⁰ A partir de las huellas, se midió la distancia entre pasos contralaterales, la distancia entre pasos ipsilaterales y la distancia de soporte. Se empleó en el análisis estadístico el promedio de los valores medidos en todos los pasos.

5- Pruebas electrofisiológicas

Luego de ser anestesiado con clorhidrato de ketamina (130 mg/kg peso) (Liorad, Cuba) / diazepam (3 mg/kg peso) (Imefa, Cuba),⁴¹ el animal se colocó en un cepo en posición dorsal para el registro del Potencial de Acción Muscular Compuesto (PAMC),⁴² utilizando el módulo de estudios de conducción nerviosa del sistema EMG Workplace del equipo NEURONICA 5 (Neuronic S.A., Cuba). Para ambas variantes se empleó una banda de filtros de 10 Hz y de 3 kHz (corte a las bajas y altas frecuencias, respectivamente), una intensidad del estímulo de 9 mA y un ancho de pulso de 0,1 ms.

5.1- Variante de Medición Bipolar (BRV)

El electrodo de registro (aguja bipolar de electromiografía) fue insertado dentro de los músculos plantares de la pata izquierda. Los electrodos de estimulación ensamblados en un mango de acrílico (dos agujas hipodérmicas 28G, separadas 5 mm) se colocaron en los segmentos siguientes: i) proximal (S1): nervios espinales inmediatamente después de la última costilla; ii) medial (S2): nervio ciático a nivel proximal e interno del muslo; iii) distal (S3): nervio peroneo a nivel de la tibia.

5.2- Variante de Medición Monopolar (MRV)

Los electrodos de estimulación (dos pinzas de acero contruidos para la especie) se colocaron en la piel del animal separados 5 mm, a cada lado de la columna vertebral a la salida de los nervios lumbares (equivalente al punto S1 del registro BRV). Se utilizaron agujas hipodérmicas de acero inoxidable (diámetro 28G) como electrodos de registro y de tierra. El electrodo positivo se colocó en la pierna izquierda (musculatura media entre la rodilla y el tobillo), y el de referencia se insertó en la membrana interdigital de la pata ipsilateral. El electrodo de tierra se insertó en el tejido subcutáneo de la espalda. Se definió el Índice Integral del PAMC (IIPAMC) para describir cuantitativamente el potencial registrado: amplitud al pico superior / (latencia de inicio x duración).

6- Microscopía electrónica

Al concluir la administración del 1,2-DAB (día 45), se escogieron aleatoriamente y se sacrificaron tres animales enfermos y un animal sano, a los que se les realizó una disección para tomar médula espinal lumbar y nervio ciático proximal (menos de 5 mm a partir de la salida de la columna vertebral). Las muestras se procesaron para microscopía electrónica⁴³ y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 200EX, Japón). Se analizaron un total de 5 microfotografías a diferentes magnificaciones.

7- Análisis estadístico

Los datos expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) fueron analizados con GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., California, EUA). Se eliminaron del análisis los animales fallecidos por efecto del 1,2-DAB. Se empleó en todos los análisis al menos un nivel de significación menor de 0,05 ($p < 0,05$) y un intervalo de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- Efecto de la administración del 1,2-DAB

Al finalizar la administración del 1,2-DAB se evidenció una disminución significativa en el peso de los animales ($13,76 \pm 0,1697$ g), lo que representa una pérdida del 28,4% respecto al peso inicial ($19,22 \pm 0,1697$ g). Por el contrario, el grupo control finalizó con un peso significativamente superior respecto al día inicial ($20,95 \pm 0,2550$ vs. $19,01 \pm 0,1597$ g). Estos ratones mostraron una reducción significativa en la fuerza muscular, lo cual se evidenció en las pruebas de suspensión en rejilla y en la varilla horizontal (reflejo prensil y capacidad de tracción). Asimismo, en la prueba de exploración en campo abierto los dos parámetros evaluados, el número de cuadrantes cruzados y el número de empinamientos, mostraron una disminución significativa por efecto del 1,2-DAB. Los animales tratados con el 1,2-DAB mostraron una pérdida significativa del reflejo extensión, lo cual se manifestó físicamente como la flexión de sus patas traseras contra la región abdominal y el cierre de los dedos. La intoxicación por el 1,2-DAB también afectó drásticamente el patrón de la marcha de los animales.

Se observó una disminución significativa en las distancias entre los pasos ipsi y contralaterales, así como un incremento en la distancia de apoyo corporal.

Estas afectaciones clínico-conductuales fueron acompañadas por un progresivo deterioro electrofisiológico. Los PAMCs obtenidos al concluir el período de intoxicación en la variante bipolar mostraron un incremento significativo de la latencia de inicio en el segmento S1, lo que indica un retardo en la conducción del potencial de acción en la parte proximal del nervio ciático. La latencia de inicio de los PAMCs en el resto de los segmentos de este nervio no mostró diferencias entre los grupos 1,2-DAB y control. De igual forma, la latencia de inicio, junto con la amplitud al pico superior y la duración, medidos en la variante monopolar en S1, estuvieron afectados significativamente por el 1,2-DAB.

La disminución del peso corporal, la pérdida de la fuerza muscular y la afectación locomotora caracterizan la progresión de la ELA tanto en pacientes como en otros modelos animales de esta enfermedad.⁴⁴⁻⁴⁸ Se ha reportado, incluso, que la malnutrición en el momento del debut acelera la progresión de la enfermedad.⁴⁹ Tanto la debilidad muscular como la posible afectación neurogénica de los músculos de la masticación y la deglución pudieron contribuir a la pérdida del peso corporal, también influenciado por la reducción del apetito a través de la inhibición de la ácido graso sintasa del hipotálamo.^{19,50}

El compromiso del segmento inicial de los axones motores posteriores fue confirmado mediante el registro del PAMC, el cual, junto a otras técnicas electroneuromiográficas, constituyen métodos reproducibles usados en el diagnóstico y la evolución de la ELA,⁵¹ en estudios preclínicos⁵² y en ensayos clínicos.⁵³ El PAMC representa la suma espacial y temporal de la actividad eléctrica de las fibras musculares ubicadas dentro del radio de registro del electrodo.⁵⁴ En nuestro estudio la latencia de inicio del PAMC aumentó significativamente por efecto del 1,2-DAB, lo cual indica que la velocidad de conducción nerviosa (VCN) se afectó de manera apreciable. El aumento en la duración y la disminución concomitante en la amplitud del PAMC pudo estar causado por la desincronización y la dispersión temporal de los impulsos nerviosos. Estos hechos también indican la afectación en la organización mielina-axón.⁵⁵ Tanto la disminución en la VCN como en la amplitud del PAMC ha sido ampliamente reportado durante la progresión de la ELA,^{56,57} asociado con la denervación y la atrofia de los músculos que finalmente conduce a la disminución drástica de la fuerza muscular.^{58,59}

El análisis ultraestructural de la región lumbar de la médula espinal y del segmento proximal del nervio ciático, reveló cambios patológicos como consecuencia del 1,2-DAB. Entre estos se encuentran las alteraciones en la organización de la vaina de mielina (VM), las inclusiones de mielina, la hipertrofia y la deformación estructural de las mitocondrias, así como la desorientación y la agregación de NFs. Los NFs, y otras proteínas relacionadas con el transporte axonal tienen un alto contenido de L-lisina, que reacciona con el 1,2-DAB para formar agregados multisubunitarios.⁶⁰ La acumulación de NFs junto a microtúbulos y organelos son los responsables de la estrangulación axonal proximal,⁶¹ lo cual es también un rasgo patognomónico de la ELA.^{62,63} La pérdida de la continuidad en la VM también contribuye a desestabilizar la fisiología axonal.⁶⁴ Siendo la mielina una estructura rica en lípidos complejos,^{65,66} la disrupción de la misma se explicaría por la reducción que produce el 1,2-DAB de las enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos, la ácido graso sintasa y la ATP citrato liasa.^{19,67} La ruptura de los dominios funcionales mielina-neurona produce una afectación severa en la conducción saltatoria rápida de los potenciales de acción.⁶⁸⁻⁷⁰

Esto desencadena en la disminución de la coordinación motora y la fuerza muscular,⁷¹ efectos que fueron constatados en nuestro modelo experimental y que igualmente se observan en otros modelos de ELA,⁷² y en la propia enfermedad, sobre todo en estadios avanzados.^{58,73} Las mitocondrias hipertrofiadas por efecto del 1,2-DAB también han sido observadas en MNs de pacientes con ELA,^{74,75} y otros modelos de la enfermedad.⁷⁶⁻⁷⁸ El daño morfológico mitocondrial se correlaciona con la reducción de su actividad respiratoria,⁷⁹⁻⁸¹ el aumento de mutaciones del ADN mitocondrial,⁸² la ejecución del programa de muerte celular,⁸³⁻⁸⁵ la reducción de las defensas antioxidantes mitocondriales,^{86,87} asociado a la generación de EROs en este organelo,^{88,89} que contribuye al establecimiento de un ambiente pro-oxidante altamente perjudicial para las MNs.

En resumen, nuestro estudio indica que la patología axonal causada por el 1,2-DAB proporciona un modelo animal alternativo adecuado para la ELA, tanto para estudios de prueba de concepto y mecanísticos como de evaluación preclínica, según las recomendaciones del Grupo Europeo de Expertos de esta enfermedad,⁹⁰ así como los criterios de Vogel y cols. (2002).⁹¹

2- Evaluación del EGF-GHRP-6 sobre la patología axonal inducida por el 1,2-DAB

En la segunda parte de la presente investigación se evaluó el posible efecto neuroprotector de la combinación EGF-GHRP-6 en este modelo de ELA. Los resultados demuestran que la administración conjunta de ambos péptidos resulta en un tratamiento efectivo para la recuperación más rápida de los animales intoxicados por el 1,2-DAB. Cada una de estas drogas individualmente no ejerció un papel significativo en la recuperación de los animales enfermos.

El grupo tratado con la combinación de ambos péptidos mostró un aumento significativo en el peso corporal respecto al grupo placebo desde la primera y hasta la última semana de tratamiento. Este grupo también evidenció una mayor recuperación en la fuerza muscular, corroborado mediante la medición del reflejo prensil y la prueba de suspensión en rejilla. Mientras tanto, la prueba de campo abierto mostró una mayor actividad locomotora en el número de cuadrantes cruzados por el grupo de la combinación a los 10 días de iniciado el tratamiento, lo cual no se evidenció en el número de empinamientos. Estos efectos estuvieron acompañados por la recuperación del patrón de la marcha, específicamente en la distancia entre pasos ipsilaterales.

La medición del PAMC en la variante bipolar no evidenció un efecto beneficioso relevante en los grupos tratados con los péptidos por separado. Sin embargo, el EGF-GHRP-6 aceleró la recuperación de la latencia de inicio del PAMC en el segmento S1 después de 15 días de administración. De manera similar, en la variante monopolar, la combinación de ambos péptidos mostró una recuperación significativa del Índice Integral del PAMC (IIPAMC), respecto al grupo placebo.

En los últimos años se ha reforzado la idea de que el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas dirigido a blancos independientes no resulta eficaz. Por el contrario, la combinación de estrategias neuroprotectoras orientadas hacia diferentes blancos de la fisiopatología subyacente tiene mayores probabilidades de éxito.^{92,93} La ELA forma parte de este grupo de enfermedades. En nuestro estudio se evidenció una recuperación significativa de los ratones tratados con la combinación EGF-GHRP-6. La pronunciada diferencia en la efectividad de la combinación respecto a cada péptido por separado, sugiere la presencia de un sinergismo potenciador entre ellos. Este tipo de sinergismo farmacológico ocurre usualmente cuando diversos

mecanismos moleculares convergen hacia un efecto celular común.^{94,95} Este parece ser el caso de la combinación EGF-GHRP-6, cuyas efectos citoprotectores individuales pudieran crear el ambiente homeostático adecuado para proteger a las MNs.⁹⁶⁻⁹⁸

El EGF se produce *in situ* en varias regiones del SN, al igual que su receptor, el EGFR, detectado en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos del cerebro y médula espinal, así como en nervios cutáneos, corpúsculos sensoriales, células gliales satelitales, neuronas sensoriales primarias de los ganglios de las raíces dorsales, y en células de Schwann.⁹⁷ Además, el EGF es permeable a la barrera hematoencefálica (BHE).⁹⁸ Una función bien conocida del EGF es su capacidad para inducir la proliferación de células neurales progenitoras en la zona subventricular adulta.¹⁰⁰⁻¹⁰⁷

Este efecto también ha sido demostrado durante el tratamiento combinado de EGF y FGF-2.¹⁰⁸ El EGF induce además la proliferación de oligodendrocitos adultos a partir de células tipo B en la zona subventricular, y aumenta su capacidad de remielinización.¹⁰⁹⁻

¹¹¹ Esta acción pudiera tener cierta relevancia en nuestro modelo para la recuperación de la vaina de mielina en la médula espinal. Como existen receptores EGFR en las células de Schwann, el efecto pudiera ser similar en los axones periféricos. La recuperación de la conducción saltatoria normal es un factor que determina el efecto positivo observado sobre el PAMC. De la misma manera, la remielinización pudiera tener un efecto relevante en la ELA.^{112,113}

Por su parte, el GHRP-6 induce la secreción de la Hormona del Crecimiento en la adenohipófisis, mediado por el receptor GHS-R1a, el cual se ha detectado en otras zonas del SN, tales como el hipotálamo, el hipocampo, la corteza cerebral, el plexo coroideo, la médula oblongada y la sustancia negra; y en otros tejidos, como en bazo, tiroides, adipocitos, páncreas, estómago, corazón y pulmones.¹¹⁴⁻¹¹⁷ El ligando endógeno del GHS-R1a es la grelina,¹¹⁸ cuyas acciones fisiológicas incluye la potenciación del apetito y la ingestión de alimentos mediante el control hipotalámico sobre esta conducta.¹¹⁹ El aumento del apetito también se ha reportado durante el tratamiento de ratas con el GHRP-6,¹²⁰ así como la contracción de la musculatura lisa gástrica en ratones con gastroparesis.¹²¹ Un compuesto de la misma familia, el GHRP-2, mejora el apetito e incrementa el peso corporal tanto en ratones,¹²² como en personas adultas¹²³ e infantes.¹²⁴ Es probable que estas propiedades hayan influenciado sobre el aumento de peso significativo observado en los ratones tratados con el EGF-GHRP-6.

El GHRP-6 incrementa los niveles de IGF-1 tanto *in vitro*²⁶ como *in vivo*, en hipotálamo, hipocampo y cerebelo de ratas machos adultas, sin afectación en los niveles de la proteína de unión a IGF-1 tipo 2 (IGFBP-2).²⁷ En estas zonas también se detectó la activación de señales intracelulares antiapoptóticas (tales como Bcl-2, Akt y PI3K). Se ha reportado un efecto positivo del GHRP-6 sobre la supervivencia neuronal del cerebelo en ratas envejecidas,¹²⁵ así como en el hipotálamo y el cerebelo de ratas tratadas sistémicamente con glutamato.^{126,127} La inducción de IGF-1 mediada por el GHRP-6 podría ejercer un amplio rango de acciones en el SNC y el SNP.³⁰ El IGF-1 induce la proliferación de células progenitoras neuronales,¹²⁸ protege a las neuronas contra diversos insultos neurotóxicos,¹²⁹ incluyendo a las MNs en cultivo contra la excitotoxicidad mediada por glutamato.¹³⁰ El IGF-1 protege *in vitro* a neuronas hipocámpales contra el estrés oxidativo mediado por las vías antiapoptóticas Akt y Bcl-2¹³¹ y la activación del factor transcripcional NF-κB.¹³² El IGF-1 también induce la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos y su diferenciación,^{133,134} previene la desmielinización inducida por el TNF-α¹³⁵ y la apoptosis de los

oligodendrocitos.¹³⁶ Además, induce la síntesis de mielina.¹³⁷ Estos efectos del IGF-1 sustentan su capacidad para inducir la remielinización, un proceso comprometido en la patofisiología de varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la ELA.¹³⁸ De hecho, este factor trófico ha sido evaluado en modelos de enfermedades desmielinizantes, como es el caso de la Esclerosis Múltiple,¹³⁹ y también de ELA.¹⁴⁰ En experimentos neuronales *in vitro*, el IGF-1 inhibió el daño oxidativo a las mitocondrias y su eventual autofagia,¹⁴¹ aumentó los niveles de Akt mitocondrial activada,¹⁴² inhibió la liberación de citocromo c y la activación de caspasas, bloqueando de esta forma la ejecución del programa apoptótico.¹⁴³⁻¹⁴⁵

El papel protector del IGF-1 sobre las mitocondrias pudiera haber contribuido al restablecimiento de los ratones tratados con el EGF-GHRP-6, inhibiendo la producción de EROs y restableciendo los niveles normales de ATP. Así mismo, favoreciendo la recuperación energética en los oligodendrocitos y las células de Schwann indispensable para la síntesis lipídica y la reorganización de la vaina de mielina. A pesar de las múltiples evidencias del papel neuroprotector del IGF-1, también se han descrito algunas desventajas, como su alto peso molecular, la dificultad para atravesar la BHE y el secuestro en la circulación mediado por las IGFBPs.¹⁴⁶ En nuestro caso, la inducción local de IGF-1 mediado por el GHRP-6 elude las dificultades anteriormente referidas.

El análisis conjunto de todas estas evidencias sugiere que el GHRP-6 pudiera contribuir a restablecer la arquitectura axonal en el modelo del 1,2-DAB mediado por el IGF-1, ya sea a partir de sus acciones protectoras sobre las MNs como sobre las células responsables de la vaina de mielina. La presencia del EGF y del IGF-1 en el microambiente de las MNs, podría ejercer una acción aditiva en la recuperación axonal, y por ende en la conducción de los impulsos nerviosos y del PAMC. Existen numerosas evidencias que demuestran un efecto sinérgico entre el EGF y el IGF-1 en varios contextos experimentales del SN, como la proliferación de células neurales progenitoras,¹⁴⁷ la inhibición de caspasas y de la fragmentación del ADN,¹⁴⁸ y la recaptación del glutamato por los astrocitos,¹⁴⁹ efectos de gran relevancia como posibles mecanismos protectores en la ELA.¹⁵⁰

Teniendo en cuenta nuestros resultados, es posible que las acciones moleculares convergentes de estos factores tróficos sean las responsables del efecto sinérgico positivo observado durante la recuperación del PAMC y de la fuerza muscular de los animales tratados con el EGF-GHRP-6. Esta estrategia terapéutica explota los mecanismos de acción de cada péptido individualmente, interviniendo en múltiples blancos de la fisiopatología neuronal, en diversos tipos celulares del SN, lo cual tiene relevancia como posible tratamiento para la ELA.¹⁵¹

Nuestros resultados constituyen una prueba de concepto que demuestra la efectividad del EGF-GHRP-6. Esta estrategia ofrece una promesa en términos de oportunidad terapéutica para los enfermos de ELA y de otras enfermedades de las motoneuronas.

CONCLUSIONES

- La axonopatía proximal inducida por el 1,2-DAB en ratones C57BL/6 presentó características ultraestructurales, clínico-conductuales y electrofisiológicas que sustentan su empleo como modelo experimental relevante en la búsqueda de

nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de las enfermedades motoneuronales espinales, particularmente de la ELA.

- La administración combinada del EGF y el GHRP-6 en ratones intoxicados por el 1,2-DAB aceleró su recuperación clínico-conductual y electrofisiológica, lo que demuestra la potencialidad de esta estrategia terapéutica en el tratamiento de la ELA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rowland LP y Shneider NA. *N Engl J Med* 2001; 344: 1688-1700.
2. Shoosmith CL y Strong MJ. *Can Fam Physician* 2006; 52: 1563-1569.
3. Andersen PM. *Suppl Clin Neurophysiol* 2004; 57: 211-27.
4. Andersen PM. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006; 6: 37-46.
5. Soriani MH y Desnuelle C. *Revue Neurologique* 2009; 165: 627-640.
6. Zaldívar T y cols. *Neurol* 2009; 72: 1640-1645.
7. Lacomblez L y cols. *Lancet* 1996; 347: 1425-31.
8. Bensimon G y cols. *N Engl J Med* 1994; 330: 585-91.
9. Kato S. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 97-114.
10. Kriz J y cols. *Exp Neurol* 2000; 163: 414-421.
11. Cai H y cols. *J Neurosci* 2005; 25: 7567-7574.
12. Tshala-Katumbay D y cols. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109: 405-410.
13. Al Chalabi A y Miller CC. *Bioessays* 2003; 25: 346-355.
14. Figlewicz DA y cols. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1757-17561.
15. Kim MS y cols. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 177: 121-131.
16. Okamoto K y cols. *Acta Neuropathol (Berl)* 1990; 80: 222-226.
17. Tshala-Katumbay D y cols. (a). *Toxicol Sci* 2009; 107(2): 482-489.
18. Tshala-Katumbay D y cols. (b). *Neurochem Res* 2009; 34: 1919-1923.
19. Tshala-Katumbay D y cols. *Toxicol Sci* 2008; 105: 134-141.
20. Tshala-Katumbay D y cols. *Act Neuropathol* 2006; 112: 317-324.
21. Ludolph AC y cols. *Amyotrophic Lat Scler* 2010; 11: 38-45.
22. Carpenter G. *Bioessays* 2000; 22: 697-707.
23. Yamada M y cols. *Prog Neurobiol* 1997; 51: 19-37.
24. Xu L y cols. *Regul Pept* 2005; 124: 119-125.
25. Cassoni P y cols. *J Endocrinol* 2000; 165: 139-46.
26. Frago LM y cols. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 701-10.
27. Frago LM y cols. *Endocrinol* 2002; 143: 4113-4122.
28. Delgado-Rubín CA y cols. *Eur J Neurosci* 2009; 29: 2115-24.
29. Delgado-Rubín CA y cols. *J Neurochem* 2006; 99: 839-849.
30. Frago LM y Chowen JA. *Adv Exp Med Biol* 2005; 567: 1-25.
31. Rico M y cols. *J Physiol Biochem* 1999; 55: 33-39.
32. Chen H y cols. *J Comp Neurol* 2007; 500: 299-310.
33. Charnay Y y cols. *J Comp Neurol* 2004; 223: 415-423.
34. Xian CJ y Zhou XF. *Front Biosci* 2004; 9: 85-92.
35. Estol L y Dugas R (eds.). [sitio en Internet] [acceso 5 sept 2008]. Disponible en: <http://www.ccac.ca>.
36. Lamberty Y y Gower AJ. *Physiol Behav* 1992; 51:81-88.
37. Tesseur I y cols. *Am J Pathol* 2000; 157: 1495-1510.
38. Metz GA y Schwab ME. *Neuroscience* 2004; 120: 563-574.
39. Crow JP y cols. *Ann Neurol* 2005; 58: 258-265.
40. Jaworski DM y cols. *J Neurobiol* 2006; 66: 82-94.
41. Flecknell P. San Diego, EUA: Academic Press, 1996.
42. Watanabe T y cols. *J Neurol Sci* 1994; 122: 140-143.
43. Spurr AR. *J Ultrastruct Res* 1969; 26:31-43.
44. Steinacker P y cols. *Am J Pathol* 2010; 176: 1409-1420.
45. Hadano S y cols. *PLoS One* 2010; 5: e9805.
46. Zhou C y cols. *Amyotrophic Lat Scler* 2007; 8: 366-372.
47. Burgess RW y cols. *Methods Mol Biol* 2010; 602: 347-93.
48. Gordon PH y cols. *Neurol* 2009; 72: 1948-1952.
49. Limousin N y cols. *J Neurol Sci* 2010; 297:36-9.
50. Lane MD y cols. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 1063-1067.
51. van Dijk JP y cols. *Muscle Nerve* 2010; 42: 239-244.
52. Martínez JA y cols. *Neurosci* 2008; 157: 908-925.
53. Cudkowicz M y cols. *NeuroRx* 2004; 1: 273-283.
54. Santos Anzorandia C. La Habana, Cuba: Editorial Ciencia Médicas; 2003.
55. Falck B y Stalberg E. *J Clin Neurophysiol* 1993; 12: 254-279.
56. Liu X y cols. *Muscle Nerve* 2009; 39: 304-309.
57. Mohammadi B y cols. *Neurol Res* 2007; 29: 425-428.
58. Carvalho M y cols. *Muscle Nerve* 2003; 28: 630-633.
59. Arasaki K y cols. *Muscle Nerve* 2002; 25: 520-526.
60. Kim MS y cols. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 183: 55-65.

61. Holzbaur EL. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 233–240.
62. Okamoto K y cols. *Acta Neuropathol (Berl)* 1990; 80: 222–226.
63. Delisle MB y Carpenter S. *J Neurol Sci* 1984; 63: 241–250.
64. Yin X y cols. *J Cell Biol* 2006; 172: 469–478.
65. Simons M y Trotter J. *Curr Op Neurobiol* 2007; 17: 533–540.
66. Sherman DL y Brophy PJ. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 683–690.
67. Mayes PA y Botham KM (a). EUA: McGraw-Hill Inc.; 2003. p. 173–179.
68. Schafer DP y Rasband MN. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 508–514.
69. Bhat MA. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 552–559.
70. Dashiell SM y cols. *J Neurochem* 2002; 81: 1263–1272.
71. Salzer JL y cols. *Glia* 2008; 56: 1532–1540.
72. Niebroj-Dobosz I y cols. *Folia Neuropathol* 2007; 45: 236–241.
73. Carvalho M y Swash M. *Muscle Nerve* 2000; 23: 344–352.
74. Siklos L y cols. *Ann Neurol* 1996; 39: 203–216.
75. Sasaki S e Iwata M. *Neurosci Lett* 1996; 204: 53–56.
76. Sasaki S y cols. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68: 365–373.
77. Jaarsma D y cols. *Acta Neuropathol (Berlin)* 2001; 102: 293–305.
78. Menzies FM y cols. *Brain* 2002; 125: 1522–1533.
79. Mayes PA y Botham KM (b). EUA: McGraw-Hill Inc.; 2003. p. 92–101.
80. Mattiazzi M y cols. *J Biol Chem* 2002; 277: 29626–29633.
81. Wiedemann FR y cols. *J Neurochem* 2002; 80: 616–625.
82. Dhaliwal GK y Grewal RP. *Neuroreport* 2000; 11: 2507–2509.
83. Martin LJ. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 186–197.
84. Martin LJ y cols. *Exp Neurol* 2009; 218: 333–346.
85. Martin LJ y cols. *J Comp Neurol* 2007; 500: 20–46.
86. Wood-Allum CA y cols. *Brain* 2006; 129: 1693–1709.
87. Fukada K y cols. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 1211–1223.
88. Starkov AA. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1147: 37–52.
89. Adam-Vizi V. *Antioxid Redox Signaling* 2005; 7: 1140–1149.
90. Ludolph AC y cols. *Amyotrophic Lat Scler* 2010; 11: 38–45.
91. Vogel HG y cols. (eds.). New York, EUA: Springer-Verlag; 2002.
92. Yakovlev AG y Faden AI. *NeuroRx* 2004; 1: 5–16.
93. Sacchetti ML y cols. *Neurol* 1997; 49 (Suppl 4): S70–S74.
94. Finkel DM y Capmourteres EM. *Rev Argent Anesthesiol* 1999; 57: 145–154.
95. De la Cruz JP y de la Sanchez CF. *Gen Pharmacol* 1991; 22: 271–74.
96. Cibrián D y cols. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 563–73.
97. Xian CJ y Zhou XF. *Front Biosci* 2004; 9: 85–92.
98. Caballero ME y cols. *Gut* 2001; 48: 34–40.
99. Pan W y Kastin AJ. *Peptides* 1999; 20: 1091–1098.
100. Grimm I y cols. *J Cell Sci* 2009; 122: 2524–2533.
101. Deleyrolle L y cols. *Stem Cells* 2006; 24: 748–62.
102. Tureyen K y cols. *Neurosurg* 2005; 57: 1254–63.
103. Raineteau O y cols. *Mol Cell Neurosci* 2004; 26: 241–250.
104. Wong RW y Guillaud L. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 147–156.
105. Teramoto T y cols. *J Clin Invest* 2003; 111: 1125–1132.
106. Mahanthappa NK y Schwarting GA. *Neuron* 1993; 10: 293–305.
107. Reynolds BA y cols. *J Neurosci* 1992; 12: 4565–4574.
108. Ohta Y y cols. *J Neurosci Res* 2006; 84: 980–992.
109. González-Pérez O y cols. *Stem Cells* 2009; 27: 2032–2043.
110. Aguirre A y cols. *Nat Neurosci* 2007; 10: 990–1002.
111. Knapp PE y Adams MH. *Exp Cell Res* 2004; 296: 135–44.
112. Canali E y cols. *Amyotroph Lateral Scler* 2009; 12: 1–2.
113. Rajabally YA y Jacob S. *Muscle Nerve* 2008; 38: 855–860.
114. Xu L y cols. *Regul Pept* 2005; 124: 119–125.
115. Date Y y cols. *Endocrinol* 2000; 141: 4255–4261.
116. Cassoni P y cols. *J Endocrinol* 2000; 165: 139–46.
117. Muccioli G y cols. *J Endocrinol* 1998; 157: 99–106.
118. Kojima M y cols. *Nature* 1999; 402: 656–660.
119. Nakazato M y cols. *Nature* 2001; 409: 194–198.
120. Locke W y cols. *Life Sci* 1995; 56: 1347–1352.
121. Qiu WC y cols. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1419–1424.
122. Alba M y cols. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289: E762–7.
123. Laferrère B y cols. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 611–614.
124. Mericq V y cols. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003; 16: 981–985.
125. Pañeda C y cols. *Neuroreport* 2003; 14: 1633–1635.
126. Delgado-Rubín CA y cols. *Eur J Neurosci* 2009; 29: 2115–24.
127. Delgado-Rubín CA y cols. *J Neurochem* 2006; 99: 839–849.
128. Dempsey RJ y cols. *J Neurochem* 2003; 87: 586–97.
129. Russo VC y cols. *Endocr Rev* 2005; 26: 916–943.
130. Vincent AM y cols. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 407–416.

131. Matsuzaki H y cols. *J Neurochem* 1999; 73: 2037-2046.
132. Heck S y cols. *J Biol Chem* 1999; 274: 9828-35.
133. Bibollet-Bahena O, Almazan G. *J Neurochem* 2009; 109: 1440-51.
134. Wilson HC y cols. *Glia* 2003; 44: 153-65.
135. Ye P y cols. *J Neurosci Res* 2007; 85: 712-22.
136. Mason JL y cols. *J Neurosci* 2000; 20: 5703-5708.
137. Espinosa JA y cols. *Dev Neurosci* 2002; 24: 227-241.
138. Chesik DKJ y Wilczak N. *J Mol Neurosci* 2008; 35: 81-90.
139. Li W y cols. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 426-438.
140. Torres-Alemán I y cols. *Neurol* 1998; 50: 772-776.
141. Gu Y y cols. *FEBS Lett* 2004; 577: 357-60.
142. Gautam N y cols. *J Neurochem* 2003; 87: 1427-1435.
143. Puche JP y cols. *Endocrinol* 2008; 149: 2620-2627.
144. Saeki M y cols. *J Cell Biochem* 2002; 84: 708-716.
145. Linseman DA y cols. *J Neurosci* 2002; 22: 9287-97.
146. Hosback S y cols. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17: 472-479.
147. Gago N y cols. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22: 162-178.
148. Limesand KH y cols. *Death Differ* 2003; 10: 345-350.
149. Suzuki K y cols. *J Cell Sci* 2001; 114: 3717-25.
150. Foran E y Trotti D. *Antioxid Redox Sign* 2009; 11: 1587-1602.
151. Vincent AM y cols. *Drug Discov Today* 2008; 13: 67-72.