

Efecto citoprotector cardíaco y extracardíaco del péptido GHRP6

✉ Danay Cibrián¹, Jorge Berlanga¹, Luis Guevara², Juan Valiente³, Gerardo E Guillén¹, Diana García¹, Olga Sonia⁴, Viviana Falcón¹, José Suárez¹

¹División de Farmacéuticos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa CP 10600, AP 6162, La Habana, Cuba E-mail: danay.cibrian@cigb.edu.cu

²Departamento de Cirugía Cardiovascular, Hospital Hermanos Ameijeiras

³Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular

⁴Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana

REPORTE

Introducción

El péptido liberador de la hormona de crecimiento 6 GHRP6 es un péptido sintético de seis aminoácidos de secuencia His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂. Fue originalmente descrito como un agente derivado de la metaencefalina intestinal y utilizado como estimulador de la secreción de la hormona de crecimiento (GH) en diferentes especies de mamíferos, incluida la humana [1, 2]. Este péptido y sus análogos sintéticos se emplean actualmente para el diagnóstico clínico de diferentes formas de enanismo [3]. El efecto de citoprotección descrito para esta molécula hasta el momento de realizar el presente estudio, se limitaba básicamente a la prevención de la disfunción cardíaca producida por la isquemia [4-6], así como en el sistema nervioso, donde parece estar mediado por el eje hormonal [7]. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre el GHRP6 y otros péptidos análogos apuntan a la existencia de diferentes estructuras de unión con estas moléculas y diferentes rutas de señalización intracelular, las cuales se manifiestan en dependencia del contexto biológico en que se evalúan estos péptidos. [8] Solo de esta forma puede explicarse la versatilidad de efectos farmacológicos recientemente descritos para estas moléculas, a los que se añaden los reportados por este estudio.

El presente trabajo se propuso como objetivo, estudiar el potencial efecto farmacológico citoprotector del hexapéptido GHRP6 como agente capaz de prevenir la muerte por necrosis o apoptosis de las células en tejidos cardíaco y extracardíacos, sometidos a diferentes insultos. Para ello, se implementó una serie de modelos versátiles *in vivo* de daño tisular, inducidos por episodios de isquemia/reperfusión (I/R), o citotoxicidad por un agente quimioterapéutico. En el caso de los fenómenos de daño por I/R, se evaluó primeramente la molécula en el contexto de un infarto agudo del miocardio (IMA) provocado en cerdos. Posteriormente, se estableció un modelo de daño múltiple de órganos (DMO) en ratas con punto de partida en un episodio de I/R prolongada en hígado. Por último, se estudió la capacidad citoprotectora del GHRP6 en un modelo de miocardiopatía dilatada (MCD) y citotoxicidad sistémica, inducida mediante la administración prolongada de Doxorubicina (DX) en ratas. Los resultados principales obtenidos en estos ensayos aparecen brevemente reportados a continuación.

Efecto de la administración del péptido GHRP6 en el rescate de masa ventricular en un modelo robusto de IMA

En el estudio se evaluó el efecto del hexapéptido GHRP6 en un modelo robusto de IMA inducido por la oclusión de la arteria circunfleja izquierda en cerdos rústicos criollos. El principal parámetro evaluado fue la reducción de la talla del infarto, aunque también se estudiaron otros aspectos relacionados con los trastornos del ritmo y la conducción asociados al episodio de I/R. En este modelo experimental robusto, el tratamiento con GHRP6 redujo en aproximadamente 70% el área infartada, así como su extensión de endocardio a epicardio (muralidad). Por otra parte, demostramos que la aplicación de GHRP6 no influye sobre el ritmo y la conducción eléctrica cuando se aplica en el marco de un episodio agudo de I/R del miocardio. En el estudio histológico de las biopsias tomadas en las zonas infartadas y adyacentes al infarto, se observó que los animales que recibieron el tratamiento con el GHRP6 presentaban un mayor grado de preservación de las fibras miocárdicas (Figura 1). El estudio comprobó también que el GHRP6 ejerció un potente efecto antioxidante, como parte del mecanismo molecular responsable de su acción cardioprotectora [9].

Efectos citoprotectores del péptido GHRP6 en un modelo de DMO inducido por un episodio de I/R del hígado

El potencial efecto citoprotector del péptido GHRP6 se estudió en un modelo de daño hepático inducido por un episodio de I/R. Además, se evaluó la acción citoprotectora ejercida de forma simultánea por este péptido sobre el daño en órganos remotos del sitio de la isquemia (pulmones, riñones e intestino delgado) coincidentes con un síndrome de DMO [10]. Los resultados histológicos y bioquímicos obtenidos en este estudio permitieron concluir que el precondicionamiento farmacológico que ejerció el péptido GHRP6 atenuó el daño hepático inducido por la I/R. Además, se demostró que la administración del GHRP6 redujo significativamente las alteraciones pulmonares tipo síndrome de distrés respiratorio, el infarto intestinal transmural y la necrosis tubular aguda en el riñón [11]. La atenuación de los daños parenquimatosos extrahepáticos indicó por primera vez un efecto de citoprotección sistémica para el

1. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the *in vitro* and *in vivo* activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984; 114(5):1537-45.

2. Ghigo E, Arvat E, Muccioli G, Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 1997;136(5):445-60.

3. Castro AI, Lage M, Peino R, Kelestimur F, Diéguez C, Casanueva FF. A single growth hormone determination 30 minutes after the administration of the GHRH plus GHRP-6 test is sufficient for the diagnosis of somatotrope dysfunction in patients who have suffered traumatic brain injury. *J Endocrinol Invest* 2007;30(3):224-9.

4. De GC, V, Rossoni G, Bernareggi M, Muller EE, Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol* 1997 Sep;334(2-3):201-7.

5. Berti F, Müller E, De Gennaro Colonna V, Rossoni G. Hexarelin exhibits protective activity against cardiac ischaemia in hearts from growth hormone-deficient rats. *Growth Horm IGF Res* 1998 Apr;8 Suppl B:149-52.

6. Locatelli V, Rossoni G, Schweiger F, Torsello A, De GC, V, Bernareggi M, et al. Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 1999;140(9):4024-31.

7. 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;143(10):4113-22.

8. Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology* 2007;86(3):147-64.

9. Berlanga J, Cibrián D, Guevara L, Domínguez 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;112(4):241-50.

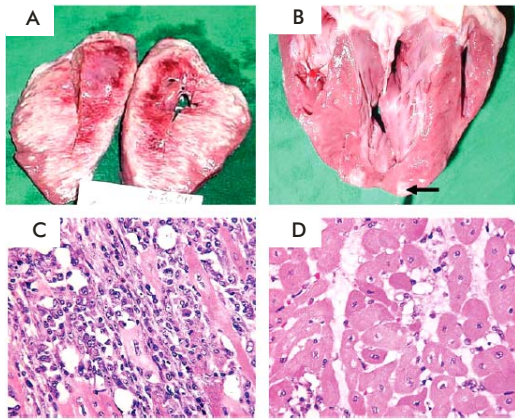


Figura 1. Efecto del GHRP6 en la talla y severidad del IMA. A, B-Imágenes macroscópicas de la talla del IMA en un animal tratado con placebo (A) y con GHRP6 (B). C, D- Apariencia histológica de la zona adyacente al centro necrótico del IMA. Nótese la mayor preservación de las fibras cardíacas y la atenuación del infiltrado inflamatorio en el grupo tratado con GHRP6 (D), en comparación con el grupo tratado con placebo (C).

GHRP6 y sugirió su potencial eficacia en el control del síndrome de respuesta inflamatoria asociado a procesos de I/R aguda y/o shock.

El estudio también demostró que el efecto citoprotector ejercido por el GHRP6 ante la I/R se asoció con la atenuación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y simultáneamente, con la preservación de los sistemas de defensa antioxidante (Tabla 1). Las evaluaciones histológicas realizadas, así como la determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) como importante marcador de la presencia de infiltrado inflamatorio; indicaron que la aplicación del péptido GHRP6 ejerció un marcado efecto antiinflamatorio en el hígado y en los órganos remotos [11]. Además, se demostró que el mecanismo molecular de la citoprotección inducida por el GHRP6 involucra la participación de las rutas de señalización intracelular mediadas por la fosfatidil inositol 3 quinasa / proteína quinasa B (PI3K/PKB, B), así como por la isoforma 1 α del factor inducido por la hipoxia (en inglés: HIF1 α); las cuales favorecen la supervivencia celular [12].

Efectos citoprotectores del péptido GHRP6 en un modelo de miocardiopatía dilatada inducido por la administración de un fármaco antineoplásico en ratas

Adicionalmente, se estableció un modelo en ratas de miocardiopatía dilatada (MCD), inducida por la administración de Doxorubicina (DX). El objetivo de este estudio fue demostrar el efecto cardioprotector y citoprotector sistémico ejercido por el péptido GHRP6, cuando se administra de forma concomitante a la DX, así como en un esquema de administración terapéutica. La administración concurrente del péptido GHRP6 a la administración prolongada del agente citostático previno totalmente la caída de la función cardíaca; evaluada por ecocardiografía como porcentaje de fracción de eyección (Figura 2A). Este efecto se

Tabla 1. Resultados de las determinaciones del estado redox celular y los marcadores inflamatorios

Parámetros Bioquímicos	Grupo Simulador	Grupo Placebo+I/R	Grupo GHRP6+I/R
HPT ^a (nmoles/mg PT ^b)	29,49 ± 1,24 (a) ^c	100,46 ± 6,46 (b)	51,16 ± 1,71 (c)
MDA ^d (nmoles/mg PT)	0,06 ± 0,01 (a)	0,25 ± 0,03 (b)	0,12 ± 0,01 (a)
SOD ^e (U/g-min)	18261,08 ± 1260,94 (a)	9173,83 ± 645,93 (b)	18029,87 ± 498,28 (a)
CAT ^f (U/g-min)	16,33 ± 3,64 (a)	580,58 ± 57,39 (b)	31,50 ± 4,30 (a)
MPO-h ^g (U/g-min)	3,65 ± 0,76 (a)	75,58 ± 11,24 (b)	33,76 ± 2,32 (c)
MPO-i ^h (U/g-min)	11,27 ± 4,18 (a)	129,18 ± 37,98 (b)	55,12 ± 7,03 (c)

^a HPT- Hidroperóxidos totales

^b mg PT- Datos reportados en relación a los miligramos de proteínas totales

^c Los datos están reportados como el valor promedio ± el error estándar de la media por grupo experimental. El análisis estadístico se realizó empleando One way Anova +Newman Keuls t-Test. Letras diferentes (a, b o c) indican diferencias estadísticamente significativas para un valor de p<0.05.

^d MDA- Malondialdehido

^e SOD- Superóxido Dismutasa

^f CAT- Catalasa

^g MPO-h- Mieloperoxidasa de hígado, marcador de infiltrado inflamatorio

^h MPO-i- Mieloperoxidasa de intestino, marcador de infiltrado inflamatorio

tradujo en una reducción significativa de la mortalidad en los animales. Igualmente, la administración terapéutica del péptido GHRP6 permitió recuperar la funcionalidad del músculo cardíaco a valores fisiológicos (Figura 2B), con lo cual fue posible atenuar el daño sistémico y disminuir consecuentemente la mortalidad de los animales.

En este modelo experimental de daño cardíaco y sistémico inducido por la DX, la administración del péptido GHRP6 atenuó también los daños observados en el epitelio de los túbulos renales, el parénquima hepático y el epitelio bronco-alveolar. Además, se demostró que el GHRP6 favorece la preservación estructural de las mitocondrias así como la atenuación de la apoptosis de las fibras cardíacas. Estos elementos son relevantes en el mecanismo molecular que permite al péptido GHRP6 preservar y recuperar la función cardíaca.

Conclusiones

La citoprotección de los tejidos ante el daño inducido por episodios de I/R o por la toxicidad de agentes químicos, es aún una necesidad clínica no cubierta. Los resultados obtenidos en estos estudios indican

10. Yang JC, Wang ZW, Li CL, Lin JH, Liu XG, Ji QX. Multiple organ injury at early stage of intestinal and hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2004;24(2):198-200, 203.

11. Cibrián D, Ajamieh H, Berlanga J, León 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;110(5):563-73.

12. Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18(12):4691-7.

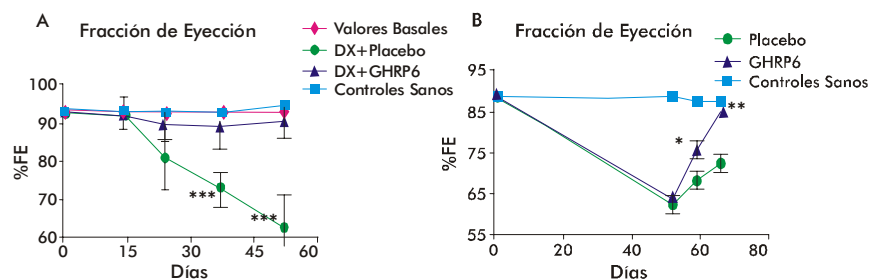


Figura 2. Resultados del estudio ecocardiográfico en el modelo de MCD. Los datos del porcentaje de fracción de eyección (%FE) están representados como el valor promedio ± el error estándar de la media por grupo experimental. Los asteriscos indican las diferencias significativas detectadas en las comparaciones por *Test de Student* no pareado entre los grupos tratados con el placebo y con el GHRP6. A: Estudio de prevención de la MCD. B: Estudio de reversión de la MCD

la potencial utilidad del péptido GHRP6 en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares relevantes como el IMA y la MCD; las cuales son causas importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial [13]. Los estudios muestran que la administración profiláctica del GHRP6 atenúa el daño inducido por la hipoxia en el hígado; considerado la principal limitación del éxito del trasplante hepático [14]. Los resultados obtenidos indican además, la capacidad del péptido GHRP6 de atenuar el DMO que se produce como consecuencia del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, desencadenado con la reperfusión

hepática. Se reportan también las acciones citoprotectoras ejercidas por esta molécula en órganos no evaluados hasta el momento, como el intestino delgado, los pulmones y los riñones. Como parte del mecanismo molecular del péptido GHRP6, se demostró que esta molécula modula positivamente el estado redox celular, lo cual es relevante en su acción citoprotectora, tanto para las enfermedades cardiovasculares como hepáticas. Finalmente se demostró que el GHRP6 favorece la supervivencia celular mediada al menos por la ruta PI3K/PKB, el HIF1 α , la atenuación de la apoptosis y la preservación estructural de las mitocondrias en las células.

13. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;29,117 (4):e25-146.

14. Barber K, Blackwell J, Collett D, Neuberger J. Life expectancy of adult liver allograft recipients in the UK. *Gut* 2007; 56(2):279-82.