

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad de La Habana

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

“Efecto neuroprotector de la coadministración del Factor de Crecimiento
Epidérmico y el Péptido-6 Liberador de Hormona de Crecimiento”

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. Diana García del Barco Herrera

Tutor: DrC. Jorge Berlanga Acosta
Asesor: DraC. Rosa María Coro-Antich

La Habana, 2012

A mi familia

Lista de Abreviaturas

µg: microgramos

µl: microlitros

µm²: micras cuadradas

1,2 DAB: 1,2 diacetilbenceno

1,2 DEB: 1,2 dietilbenceno

AMPA: ácido propiónico 3-hidroxi-5metil-4-isoxalzole

Akt: Oncogén homólogo al timoma viral murino

Bad: promotor de muerte celular asociado a Bcl-2 (por sus siglas en inglés)

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2 (por sus siglas en inglés)

Bcl-2: Factor 2 del linfoma de células B (por sus siglas en inglés)

BDNF: Factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro (por sus siglas en inglés)

CNTF: Factor neurotrófico ciliar (por sus siglas en inglés)

DNA: ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)

EAE: Encefalitis autoinmune experimental

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés)

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés)

ELAe: Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica

ELAf: Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar

ERBB: Familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

GDNF: Factor de crecimiento nervioso derivado de las glías (por sus siglas en inglés)

GHRP₆: Péptido secretagogo de la hormona de crecimiento (por sus siglas en inglés)

GHS: Secretagogo de hormona de crecimiento (por sus siglas en inglés)

GHSR: Receptor de secretagogos de hormona de crecimiento (por sus siglas en inglés)

GPDH: Enzima gliceraldehído -3-Fostato deshidrogenasa (por sus siglas en inglés)

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (por sus siglas en inglés)

IGFBP: Proteínas de unión al IGF-1 (por sus siglas en inglés)

iNOS: Enzima oxido nítrico sintasa inducible (por sus siglas en inglés)

IPAMCI: Índice del potencial de acción muscular complejo integrado

MAP-2: Proteína 2 asociada a microtúbulos (por sus siglas en inglés)

mm²: milímetros cuadrados

MOG: glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (por sus siglas en inglés)

Mt: Micobacterium tuberculosis

NF-κβ: Factor nuclear kappa activador de células B (por sus siglas en inglés)

ng: nanogramos

NMDA: N-metil-D-aspartato

PAMC: Potencial de acción muscular complejo

PBS: Solución tampón (por sus siglas en ingles, Phosphate Buffered Saline)

PDI: Proteína disulfuro Isomerasa

PI3K: Fosfatidil-inositol 3 quinasa

RNA: Acido ribonucleico (por sus siglas en inglés)

rRNA : Acido ribonucleico ribosomal (por sus siglas en inglés)

RT-PCR: Reverso transcripción seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y en tiempo real (por sus siglas en inglés)

SOD1: Enzima superóxido dismutasa tipo 1.

STU: estaurosporina (acrónimo derivado del nombre en inglés)

TGFα: Factor de crecimiento transformante tipo alfa (por sus siglas en inglés).t-

PA: Activador tisular del plasminógeno (por sus siglas en inglés).

X²: Chi cuadrado

Síntesis

Los enfoques terapéuticos dirigidos a la neuroprotección en el campo de la neurología clínica constituyen grandes retos para la medicina contemporánea. La fisiopatología compleja de las enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes e isquémicas del sistema nervioso central es una de las causas que explican por qué, aun existiendo numerosas investigaciones en este campo, no se ha logrado disponer de alternativas terapéuticas exitosas. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto terapéutico de la combinación de dos moléculas con potencialidades neuroprotectoras; el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Péptido 6 liberador de hormona de crecimiento (GHRP₆), como ejemplo de terapia combinada para el sistema nervioso central.

Se utilizaron modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, agudos y crónicos, que reproducen las características fisiopatológicas más relevantes de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la Esclerosis Múltiple y la Enfermedad Cerebro Vascolar Isquémica.

Los resultados obtenidos evidenciaron un beneficio terapéutico de la combinación EGF+GHRP₆. Los efectos citoprotectores del EGF y del GHRP₆, comunes o exclusivos, se superponen y se potencian en los diferentes contextos de patología del sistema nervioso central. Asimismo, independientemente de la etiología de cada enfermedad, la preservación celular puede mejorar mediante la terapia combinada con EGF+GHRP₆.

El tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ resulta ventajoso porque influye simultáneamente en varios blancos celulares, moleculares y bioquímicos, además de que amplifica la síntesis de factores neuroprotectores endógenos como el IGF-1, que normalmente ocurre como respuesta a un daño.

La correspondencia entre efecto clínico y patológico demostrado en este trabajo de tesis con la combinación EGF+GHRP₆ es uno de los parámetros más importantes que la comunidad científica especializada exige para la selección de candidatos neuroprotectores.

Facultad de Ciencias Médicas	1
Lista de Abreviaturas.....	2
Síntesis	1
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivos Específicos	3
Novedad Científica.....	4
Aporte teórico.....	4
Aporte práctico y social	5
Estructura del documento de tesis	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2. 1 Factor de Crecimiento Epidérmico	8
2. 2 Péptido-6 liberador de hormona de crecimiento (GHRP ₆)	9
2. 3 Neuroprotección	10
2. 4 Esclerosis Lateral Amiotrófica	11
2. 4. 1 Epidemiología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica	11
2. 4. 2 Fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica	11
2. 4. 3 Terapias vigentes en Esclerosis Lateral Amiotrófica	13
2. 4. 4 Experiencias preclínicas en Cuba.....	14
2. 5 Esclerosis Múltiple	14
2. 5. 1 Epidemiología de la Esclerosis Múltiple.....	14
2. 5. 2 Fisiopatología de la Esclerosis Múltiple	14
2. 5. 3 Terapias vigentes en la Esclerosis Múltiple	16
2. 5. 4 Experiencias preclínicas en Cuba.....	18
2. 6 Isquemia Cerebral	18
2. 6. 1 Epidemiología de la isquemia cerebral	18
2. 6. 2 Fisiopatología de la isquemia cerebral	18
2. 6. 3 Terapias vigentes en enfermedad cerebrovascular isquémica	20
2. 6. 4 Experiencias preclínicas en Cuba.....	25
2. 7 Modelos experimentales.....	25
2. 7. 1 Modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica	25
2. 7. 2 Modelos de Esclerosis Múltiple	27
2. 7. 3 Modelos de enfermedad cerebrovascular isquémica en gerbil de Mongolia	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	30
3. 1 Diseño Experimental de la tesis	30

4. EFECTOS DEL EGF, GHRP₆ Y DE LA COMBINACIÓN EGF+GHRP₆ EN MODELOS DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA Y DE AXONOPATÍA TÓXICA COMO EJEMPLO DE ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA.....	32
4. 1 Materiales y Métodos.....	32
4. 1. 1 Efectos del EGF y del GHRP ₆ en cultivo de motoneuronas embrionarias en ausencia de factores tróficos	32
4. 1. 2 Efectos del EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+GHRP ₆ en un cultivo mixto de motoneuronas embrionarias expuestas a un agente inductor de apoptosis.....	33
4. 1. 3 Efecto de la co-administración de EGF+GHRP ₆ en animales transgénicos que sobre-expresan el gen de la superóxido dismutasa humana (Tg SOD1 G93A).....	35
4. 1. 4 Efectos del EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+GHRP ₆ en un modelo de patología axonal inducida con 1,2 diacetilbenceno	37
4. 2 Resultados	41
4. 2. 1 Efectos del EGF y del GHRP ₆ en cultivo de motoneuronas embrionarias puras.....	41
4. 2. 2 Efectos del EGF, GHRP ₆ y la combinación EGF+GHRP ₆ en un cultivo mixto de motoneuronas embrionarias expuestas a un agente inductor de apoptosis.....	41
4. 2. 3 Efecto del EGF+GHRP ₆ sobre la expresión cuantitativa de los genes IGF-1 y TNF α en la médula espinal de los animales transgénicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A)	44
4. 2. 4 Efectos de EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+GHRP ₆ en un modelo de patología axonal inducida con 1,2 DAB	46
4. 3 Discusión	52
4. 3. 1 Efectos del EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+GHRP ₆ en cultivos de motoneuronas embrionarias.....	52
4. 3. 2 Efecto del EGF+GHRP ₆ en la expresión cuantitativa de los genes IGF-1 y TNF α en la médula espinal de los animales transgénicos para SOD1	56
4. 3. 3 Efecto de la administración de EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+ GHRP ₆ en el modelo de patología axonal inducida por el 1,2 DAB	58
4. 4 Resumen de Resultados	64
5. EFECTOS DEL EGF, GHRP₆ Y DE LA COMBINACIÓN EGF+GHRP₆ EN MODELOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE COMO EJEMPLO DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE ..	65
5. 1 Materiales y Métodos.....	65
5. 1. 1 Animales de experimentación.....	65
5. 1. 2 Inducción de EAE moderada	65
5. 1. 3 Inducción de EAE severa	66
5. 1. 4 Administración del EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+GHRP ₆	66
5. 1. 5 Evaluación clínica	67
5. 1. 6 Evaluación histológica	67
5. 1. 7 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP ₆ en la expresión del transcrito de IGF-1 en el cerebro de los animales con EAE moderada.....	68

5. 1. 8 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP ₆ en los niveles séricos de malonildialdehído en los animales con EAE	69
5. 2 Resultados	69
5. 2. 1 Efectos de los tratamientos con EGF, GHRP ₆ y EGF+GHRP ₆ en el modelo de EAE moderada	69
5. 2. 2 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP ₆ en el modelo de EAE severa	71
5. 2. 3 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP ₆ en los niveles séricos de malonildialdehído	73
5. 2. 4 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP ₆ en la expresión del transcrito de IGF-1 en cerebro	73
5. 3 Discusión	74
5. 3. 1 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP ₆ en modelos experimentales de Esclerosis Múltiple	74
5. 4 Resumen de Resultados	78
6. EFECTOS DEL EGF, GHRP₆ Y DE LA COMBINACIÓN EGF+GHRP₆ EN MODELOS DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN COMO EJEMPLO DE ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	79
6. 1 Materiales y Métodos	79
6. 1. 1 Animales de experimentación	79
6. 1. 2 Procedimiento quirúrgico	79
6. 1. 3 Grupos experimentales	79
6. 1. 4 Evaluación del estado neurológico	80
6. 1. 5 Caracterización del polígono de Willis en los animales de experimentación	82
6. 1. 6 Histología y morfometría	83
6. 2 Efectos del EGF, GHRP ₆ y la combinación EGF+GHRP ₆ en los modelos de isquemia cerebral global	85
6. 2. 1 Modelo de isquemia cerebral global severo	85
Evaluación cualitativa	86
Evaluación cuantitativa: análisis de la densidad neuronal	87
6. 2. 2 Modelo de isquemia cerebral global moderada	89
6. 3 Discusión	92
6. 3. 1 Efectos del EGF, GHRP ₆ y de la combinación EGF+GHRP ₆ en los modelos de isquemia cerebral global severa y moderada	92
6. 4 Resumen de Resultados	99
7. DISCUSIÓN GENERAL	100
7. 1 Importancia de la terapia combinada en las enfermedades del sistema nervioso	100
7. 2 Potencialidades del EGF y del GHRP ₆ como neuroprotectores: Racionalidad de la coadministración EGF+GHRP ₆	101
8. CONCLUSIONES	105
9. RECOMENDACIONES	106

10. AUTOBIBLIOGRAFIA	107
10. 1 Artículos científicos relacionados con el tema de tesis	107
10. 2 Artículos científicos no relacionados directamente con el tema de tesis	107
10. 3 Patentes y certificados de autor de invención relacionados con el tema de tesis	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
Anexo A.....	141

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles que afectan al sistema nervioso de manera aguda o crónica han sido, en los últimos años, objeto de intensa investigación en función de buscar alternativas terapéuticas que permitan detener o aminorar la morbilidad permanente asociada a éstas. Aun así, los beneficios terapéuticos en el tema de neuroprotección son todavía muy modestos. Para enfermedades frecuentes y devastadoras como la Esclerosis Múltiple y la Isquemia Cerebral, o poco frecuente pero igualmente devastadora como la Esclerosis Lateral Amiotrófica, se han propuesto tratamientos novedosos, que si bien han sido adecuados desde el punto de vista de la racionalidad del diseño, al dirigirse solamente a un punto clave de la fisiopatología, el resultado en la clínica no ha cumplido la expectativa. La complejidad de la fisiopatología de las enfermedades del sistema nervioso radica en que diversos mecanismos confluyen en determinar la muerte celular, lo cual implica que un medicamento dirigido solamente a uno de estos mecanismos debe ser insuficiente para bloquearlos de manera simultánea (1).

La Isquemia Cerebral es la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad en adultos (2). La Esclerosis Múltiple es la enfermedad neurológica que con más frecuencia afecta a adultos jóvenes (3) y se asocia con una morbilidad creciente y de larga duración (4). La Esclerosis Lateral Amiotrófica, aunque poco frecuente, es una de las enfermedades más devastadoras del sistema nervioso, y permanece casi huérfana de alternativas terapéuticas (5). Aunque disímiles en su etiología, sintomatología y curso evolutivo, entre estas enfermedades existen elementos fisiopatológicos comunes: mecanismos que inducen a la muerte celular, expresión exacerbada de citocinas inflamatorias, estrés oxidativo y toxicidad mediada por el ácido glutámico (6-8).

La demostración de la efectividad terapéutica de un candidato neuroprotector en modelos experimentales de diversas enfermedades neurológicas, constituye una prueba de concepto robusta del efecto neuroprotector de dicho candidato.

La neuroprotección es una alternativa terapéutica o profiláctica, cuyo objetivo es la prevención de la pérdida neuronal que ocurre en enfermedades del sistema nervioso (9). La neuroprotección como aproximación terapéutica implica proteger las células del sistema nervioso expuestas al daño y fortalecer los mecanismos endógenos que intervienen en la neuroregeneración (10). Durante años se han estudiado numerosas estrategias neuroprotectoras, por ejemplo: los antagonistas de amino ácidos excitatorios, los bloqueadores de canales de calcio, la hipotermia, los barbitúricos y los factores de crecimiento, entre otros. Llama la atención que la efectividad de estas estrategias, demostrada en estudios preclínicos, no se ha podido reproducir en la clínica (11).

Una de las razones que explican que los resultados experimentales no se reproduzcan en los estudios clínicos, es que los múltiples mecanismos fisiopatológicos del daño cerebral no pueden abordarse con un solo agente farmacológico para controlar toda la cascada de eventos bioquímicos moleculares que se producen en ese contexto. La terapia combinada es, entonces, una elección promisoriosa para el tratamiento de enfermedades complejas del sistema nervioso.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el péptido-6 liberador de la hormona de crecimiento (GHRP₆) han mostrado sus propiedades citoprotectoras en varios contextos clínicos y experimentales relacionados con el sistema nervioso. Los efectos citoprotectores del EGF y el GHRP₆ estimulan mecanismos pleiotrópicos de supervivencia, los cuales se han evidenciado en la mayor resistencia al daño de varias líneas celulares ante un amplio espectro de situaciones patogénicas (12-16).

El EGF y la metaencefalina intestinal, del cual el GHRP₆ es un derivado sintético (17), son moléculas relevantes tanto en la ontogenia como en la fisiología del sistema nervioso (18-22). Los mecanismos de acción del EGF y del GHRP₆ tienen blancos comunes y blancos exclusivos en la cascada de eventos fisiopatológicos de las enfermedades del sistema nervioso. Como el EGF y el GHRP₆ comparten efectos antiapoptóticos (23-25) y anti-excitotóxicos (26;27) y activan otros eventos como la neurogénesis (28), la remielinización (29), y la inducción de factores neuroprotectores

endógenos (30;31), parece razonable que su administración combinada pueda ejercer efectos terapéuticos beneficiosos en enfermedades neurológicas complejas donde la muerte celular es un evento patológico importante.

Estas evidencias nos motivaron a demostrar de manera experimental los efectos neuroprotectores del uso combinado de EGF y GHRP₆ en varios contextos que reproducen enfermedades del sistema nervioso.

Tomando en consideración estos antecedentes, formulamos la siguiente **hipótesis**:

El uso combinado de EGF y GHRP₆ puede tener efecto neuroprotector en enfermedades degenerativas, desmielinizantes e isquémicas del sistema nervioso.

A partir de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Investigar el efecto de la combinación EGF y GHRP₆ como posible alternativa terapéutica de neuroprotección en modelos experimentales de enfermedades del sistema nervioso

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto neuroprotector de la combinación EGF y GHRP₆ en modelos experimentales de Esclerosis Lateral Amiotrófica y Axonopatía Tóxica, como ejemplo de enfermedades neurodegenerativas
2. Evaluar el efecto neuroprotector de la combinación EGF y GHRP₆ en modelos experimentales de Esclerosis Múltiple, como ejemplo de enfermedad desmielinizante del sistema nervioso
3. Evaluar el efecto neuroprotector de la combinación EGF y GHRP₆ en modelos experimentales de isquemia cerebral global, como ejemplo de enfermedad cerebrovascular

Novedad Científica

En este trabajo se demuestra por vez primera que la combinación de EGF y GHRP₆ como alternativa terapéutica para neuroprotección tiene efectos beneficiosos en modelos experimentales de enfermedades del sistema nervioso: degenerativa, autoinmune y cerebro-vascular. Lo anterior fortalece la prueba de principio acerca de la capacidad neuroprotectora de la combinación EGF y GHRP₆, porque un buen neuroprotector o una estrategia neuroprotectora debe ser capaz de exhibir sus propiedades en diferentes contextos etiopatogénicos.

En los modelos de enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica, el efecto del tratamiento con esta combinación demostró proteger las células más vulnerables, las motoneuronas, contra la inducción de apoptosis; además se demostró una reducción de citocinas inflamatorias como el TNF α , un incremento del IGF-1 y se produjo una mejor recuperación clínica y de parámetros electrofisiológicos. En los modelos de enfermedades autoinmunes como la Esclerosis Múltiple, la combinación EGF+GHRP₆ atenuó la sintomatología clínica, aumentó la supervivencia en las formas severas, redujo los niveles séricos de un marcador biológico de peroxidación lipídica e incrementó la expresión de transcritos de IGF-1 en el cerebro. Por último, en el modelo de isquemia cerebral global, este tratamiento atenuó los signos clínicos neurológicos, redujo el área de las zonas de daño cerebral producidas por la isquemia-reperfusión, y conservó la población neuronal. La correspondencia entre el resultado clínico beneficioso y la reducción del daño a nivel de tejido es uno de los criterios que con más fuerza definen una buena estrategia de neuroprotección (32). Estos resultados no han sido descritos con anterioridad en la literatura científica.

Aporte teórico

Uno de los principales aportes teóricos de este trabajo es la demostración del efecto de combinar las propiedades citoprotectoras del EGF y del GHRP₆. Con el uso terapéutico

combinado de estos agentes se logran efectos biológicos que aumentan la tolerancia al daño de las células del sistema nervioso.

Otro aporte de este trabajo es la validación del modelo de patología axonal que reproduce la Esclerosis Lateral Amiotrófica, que fue caracterizado desde el punto de vista clínico, conductual y electrofisiológico.

En este trabajo se expone y fundamenta por qué la caracterización del polígono de Willis es un complemento necesario para los modelos de isquemia cerebral en gerbil. Este trabajo es pionero en la incorporación del análisis del grado de anastomosis entre los sistemas vertebro-basilar y carotídeo como variable a controlar y además por considerar su contribución al interpretar los resultados de las intervenciones farmacológicas.

En este trabajo se establece una pauta para la evaluación farmacológica de posibles candidatos neuroprotectores: la evaluación del candidato o de la estrategia debe realizarse en varios modelos, tanto de una misma enfermedad como de enfermedades diferentes. Así, las evaluaciones individuales constituyen pruebas de concepto, que como piezas de conocimiento sustentan la capacidad neuroprotectora del candidato en diferentes contextos etiopatogénicos.

Aporte práctico y social

La neuroprotección aplicable a enfermedades neurodegenerativas para detener su curso, o instrumentada para revertir el daño y facilitar eventos regenerativos, es aún una necesidad clínica no cubierta. El aporte práctico y social de estos resultados es la demostración de la utilidad de la combinación EGF+GHRP₆ en el tratamiento de enfermedades degenerativas, desmielinizantes e isquémicas del sistema nervioso, en las cuales la muerte celular es un elemento común. Estas enfermedades constituyen importantes causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.

La reproducción de los efectos neuroprotectores de la combinación EGF+GHRP₆ en estudios clínicos constituirá una incuestionable contribución a la medicina

contemporánea, así como un indudable beneficio al tratamiento y la calidad de vida de los enfermos, con el consecuente beneficio a sus familias y a la sociedad.

Es importante señalar que tanto el EGF como el GHRP₆ son productos disponibles en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, cada uno con un expediente de estudios fármaco-toxicológicos validado por el departamento del control de la calidad, lo cual implica que ambas moléculas están disponibles para la realización de estudios clínicos.

Los resultados de este trabajo conforman el expediente de estudios de eficacia preclínica que se presentará a la entidad regulatoria cubana (CECMED) para solicitar la aprobación de los ensayos clínicos con la combinación EGF+ GHRP₆ en pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica, Infarto Cerebral y Esclerosis Múltiple.

Los resultados que conforman esta tesis han sido objeto de dos patentes concedidas en la Oficina de Patentes de Europa, y en países como Rusia, China, Sudáfrica, entre otros. También han originado 3 publicaciones en revistas internacionales arbitradas. Uno de estos artículos fue premiado en el Concurso Central del Premio Anual de Salud (Mayo 2011) y recibió el Premio Anual de Salud (Noviembre 2011). Algunos de estos trabajos se consideraron como logros científicos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, y se presentaron en 4 eventos internacionales relacionados con las temáticas de enfermedades neurodegenerativas. Una parte de los resultados de este trabajo constituyeron una tesis de la maestría de neurociencia, la cual fue seleccionada como mejor tesis en el certamen del Premio Anual de Salud.

Estructura del documento de tesis

La tesis cuenta con un total de 125 páginas de texto, distribuidas en los siguientes acápites: Introducción (7 páginas), Revisión Bibliográfica (21 páginas) y Materiales y Métodos General (2 páginas). A continuación se presentan tres capítulos correspondientes a cada una de las enfermedades que se abordan en esta tesis. Cada uno de estos contiene acápites de materiales y métodos, resultados, discusión y

resumen de resultados: Capítulo de neuroprotección en modelos de enfermedad degenerativa (27 páginas), Capítulo de neuroprotección en modelos de enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso (10 páginas), Capítulo de neuroprotección en enfermedad cerebrovascular (15 páginas). El documento cuenta, además, con un capítulo de Discusión General (3 páginas), uno de Conclusiones (1 página) y otro de Recomendaciones (1 página). El documento también contiene la Síntesis, la Tabla de Contenido, la Lista de abreviaturas, la Autobiografía, la lista de Referencias Bibliográficas y los Anexos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. 1 Factor de Crecimiento Epidérmico

La familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) comprende 6 moléculas peptídicas estructuralmente relacionadas: el EGF, el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF α), la anfiregulina (AR), el EGF de unión a heparina (HB-EGF), la betacelulina (BTC) y la epiregulina (EPR). Existen 4 genes que codifican diferentes miembros de la familia de los receptores de EGF (EGFR); el EGFR (ERBB1), y los homólogos 2, 3 y 4 del oncogén de la leucemia eritroblástica viral (ERBB2, ERBB3 y ERBB4, respectivamente). Todos estos receptores son del tipo tirosina-quinasa (33-36).

De manera general, los receptores ERBB se activan por unión de ligandos de la familia EGF o de la familia de las neuregulinas (NRG) (las que se unen a ERBB3 y/o ERBB4), y transducen la señal a través de homo o heterodimerización con otras moléculas ERBB, seguido de auto o transfosforilación de residuos de tirosina presentes en sus extremos citoplasmáticos. A continuación se activan múltiples vías de señalización intracelular, incluyendo la vía Ras-Raf-MAPK, y la vía del fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI3K) y el oncogén homólogo al timoma viral murino (AKT), (PI3K-AKT). La activación de estas vías de transducción de señales promueve dos eventos: la proliferación celular y la citoprotección por inhibición de las señales de apoptosis (37;38). La fosforilación de AKT mediada por PI3K estimula los mecanismos de supervivencia celular mediante la fosforilación del promotor de muerte celular asociado a Bcl-2 (Bad), lo cual determina que este pierda sus funciones pro-apoptóticas y que no se active la caspasa 9 (39). AKT también favorece los mecanismos de supervivencia celular mediante la activación de genes de supervivencia a través de la activación del factor nuclear *kappa* activador de células B (NF- κ B) (40).

La familia EGF está implicada en procesos fisiológicos tales como el crecimiento, la diferenciación, el mantenimiento y la reparación de varios tejidos incluyendo los del sistema nervioso (41). Por su parte, el receptor de EGF (EGFR) se encuentra en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, motoneuronas, nervios cutáneos, corpúsculos sensoriales, células gliales satélites, neuronas sensoriales primarias de los ganglios de las raíces dorsales, y en células de Schwann (21).

Además de su función neurotrópica, el EGF tiene otros efectos en el sistema nervioso: estimula la proliferación de células madres progenitoras multipotentes, la migración celular durante la ontogenia y la diferenciación de neuronas y glías (21;42). Su ausencia en el microambiente celular facilita la muerte celular debida a especies reactivas del oxígeno y a la activación de caspasas (23). En cultivos primarios de neuronas, el EGF favorece la supervivencia y la diferenciación estructural de éstas (43).

El EGF protege a las neuronas en cultivo tanto en condiciones de hiperoxia (41;44) como en anoxia (45). En cultivos mixtos de neuronas y glías, el EGF resultó ser el más potente inductor de re-mielinización al comparar con otros factores de crecimiento y hormonas (46). En modelos experimentales *in vivo* el EGF también ha demostrado su efecto protector: ante el daño químico a neuronas del bulbo olfatorio, el tratamiento con EGF no solo resultó beneficioso por favorecer la regeneración de estas células, sino también su re-inervación (47).

2. 2 Péptido-6 liberador de hormona de crecimiento (GHRP₆)

En los primeros años de la década del 1980 se describió un grupo de sustancias sintéticas con propiedades liberadoras de la hormona de crecimiento (48). Estos compuestos se desarrollaron a partir de la molécula metaencefalina mediante cálculos teóricos de energía conformacional, modificaciones químicas y estudios de actividad biológica. Este grupo de moléculas, denominadas secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS), incluye los péptidos 1, 2 y 6 liberadores de la hormona de crecimiento (GHRP₁, GHRP₂ y GHRP₆), la hexarelina, y compuestos no peptídicos como el MK-0677 (48;49).

El GHRP₆ es una de las moléculas más estudiadas de la familia de los GHS. Es un péptido soluble y de gran estabilidad, de seis aminoácidos, cuya secuencia es: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (48). La liberación de la hormona de crecimiento inducida por el GHRP₆ depende de la dosis, y ocurre en varias especies de mamíferos, incluyendo al humano (50). Esta acción se logra mediante la administración de los GHRP por vía intravenosa, subcutánea, intranasal e incluso oral (51). Actualmente, los GHRP se emplean en la práctica clínica de enfermedades neuroendocrinas, tanto para diagnóstico como para tratamiento (52;53).

El receptor específico de los secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) está presente mayoritariamente en la hipófisis anterior, en el hipotálamo, en motoneuronas y en otras áreas del cerebro (54-57). El GHS-R es un receptor unido a proteína G y la unión de sus ligandos activa la vía de señalización de la fosfolipasa C, lo que provoca un incremento de la concentración de inositol-1,4,5 trifosfato, así como la activación de la proteína quinasa C (58). Así se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular que facilita la liberación de la hormona de crecimiento por los somatotropos (59).

El efecto más conocido de la hormona de crecimiento es la inducción de la expresión del IGF-1 en el hígado (60) y en el cerebro (61). Pero la hormona de crecimiento también tiene efectos neuroprotectores directos, independientes del IGF-1 que se produce en el hígado o del que se induce localmente en el cerebro (62). En modelos experimentales de daño cerebral por hipoxia o isquemia, el tratamiento con hormona de crecimiento atenuó los cambios morfológicos característicos de la isquemia y se redujo la expresión de los marcadores de apoptosis (63;64). El tratamiento profiláctico con hormona de crecimiento en un modelo de daño neuronal por hipertermia evidenció su capacidad neuroprotectora (65).

Además de la actividad endocrina, los GHRP ejercen acciones de neuroprotección, mediadas fundamentalmente por la expresión de IGF-1 (66) y por inducir la proliferación de neuronas (67). El IGF-1 induce la actividad transcripcional y la capacidad de unión al DNA del factor nuclear Kappa- Beta, al que se le ha imputado un papel neuroprotector contra el estrés oxidativo (68). Este factor activa la vía metabólica de las enzimas fosfatidil inositol 3-quinasa y AKT (68;69), lo cual produce un marcado efecto anti-apoptótico (70-72). Además, se ha demostrado que el IGF-1 atenúa la respuesta inflamatoria porque reduce la expresión de citocinas inflamatorias como el TNF α y la interleucina 1- β (73).

2. 3 Neuroprotección

La neuroprotección es un conjunto de acciones o estrategias terapéuticas o profilácticas cuyo propósito es prevenir, interrumpir o enlentecer la pérdida o el daño de neuronas que ocurre en las enfermedades del sistema nervioso (11;74). Aunque inicialmente el

término neuroprotección solo definía la protección de las neuronas, hoy se conoce que para garantizar la integridad de los tejidos nerviosos, las estrategias de neuroprotección tienen que abarcar a todos los tipos celulares del cerebro, lo cual incluye microglías, astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales (75). Como la disfunción endotelial también contribuye al daño tisular en la isquemia cerebral, la protección de las células endoteliales es importante porque evita la proliferación de las células de musculatura lisa, la inflamación, y la apoptosis de las células del endotelio (76).

2. 4 Esclerosis Lateral Amiotrófica

2. 4. 1 Epidemiología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una parálisis muscular progresiva producto de la degeneración de las motoneuronas en la corteza motora primaria, el tallo cerebral y la médula espinal (77).

Aunque la mayoría de los casos de Esclerosis Lateral Amiotrófica son esporádicos (ELAe), un 5 % de los casos tienen una historia familiar (ELAf). La incidencia y la prevalencia de la ELAe son de 1.89/ 100 000 habitantes y de 5.2/ 100 000 habitantes respectivamente (78). El rango de edad en que comienza la ELAe es entre 55 y 65 años y es más frecuente en hombres. La edad de inicio en la ELAf es entre 45 y 55 años, afecta por igual hombres y mujeres y tiene una supervivencia más corta (79). En los Estados Unidos la tasa de mortalidad por Esclerosis Lateral Amiotrófica es 1.84 / 100 000 habitantes (78), en Cuba la frecuencia de muerte por Esclerosis Lateral Amiotrófica es considerablemente más baja, 0,83/ 100 000 habitantes, lo cual sugiere que, debido a las características de la población cubana, existe algún factor protector conferido por los genes de ancestros africanos, pues en las personas con mezcla étnica la tasa de mortalidad fue de 0,55 / 100 000 habitantes, mientras que para los blancos fue de 0,93 / 100 000 habitantes (80).

2. 4. 2 Fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica

No existe un único agente causal para la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la mayoría de los autores coinciden en que el factor causal de la degeneración de motoneuronas es una relación compleja de factores genéticos y ambientales. En la fisiopatología de la

degeneración de motoneuronas concurren múltiples mecanismos celulares patogénicos (81) (Anexo A) que incluyen:

Factores genéticos. Se han encontrado numerosas mutaciones asociadas a ELAf y ELAe en un grupo considerable de genes (82). Algunas de estas mutaciones le confieren a la proteína que codifican una ganancia de función tóxica como en el gen SOD1, asociado a un 2% de la ELAf (83) o le producen una pérdida de función como en el caso de la mutación del gen TDP-43, que se ha descrito en ELAf y ELAe (84;85).

Excitotoxicidad: La excitotoxicidad es el daño neuronal inducido por la estimulación excesiva del glutamato en los receptores post-sinápticos NMDA y AMPA.(86). La sobreestimulación de estos receptores produce un flujo de calcio al interior de las neuronas que activa las enzimas dependientes de calcio y la formación de óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno (EROs) responsables de la neurodegeneración porque dañan los organelos e inducen muerte celular. La pérdida del transportador de amino ácidos excitatorios EEAT2 en las glías ha sido atribuido como causa del incremento del glutamato (87;88).

Estrés oxidativo: El estrés oxidativo y la formación de especies reactivas de oxígeno están muy relacionados con los procesos neurodegenerativos. En el líquido cefalorraquídeo de pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica se han encontrado cambios bioquímicos que reflejan el daño inducido por radicales libres (89).

Disfunción mitocondrial: Se han descrito cambios morfológicos y mutaciones en las mitocondrias en pacientes con ELAe (90) y en el ratón transgénico SOD1 (91). Se han encontrado altos niveles de calcio (92) y reducción en la actividad de los complejos I y IV de la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (93).

Agregación de neurofilamentos, proteínas intra-citoplasmáticas y de organelos membranosos: Las inclusiones intra-citoplasmáticas y el ensamblaje anormal y la agregación de neurofilamentos son rasgos histopatológicos característicos en ELAe y ELAf (82). La acumulación de organelos membranosos, como el retículo endoplásmico liso, descrita en axones proximales de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica interrumpe el transporte axonal (94).

Disfunción de células no neuronales que adquieren un fenotipo autoinmune inflamatorio: La respuesta inflamatoria mediada por la activación de microglías y células dendríticas tiene un rol prominente en la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica y de su modelo animal, el ratón Tg SOD1. La activación de esas células produce la liberación de citocinas inflamatorias (95;96).

La carencia de factores neurotróficos es otro de los elementos fisiopatológico que interviene en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, lo cual puede deberse a la afectación de los astrocitos que normalmente son fuente de factores tróficos (88). En pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica se ha constatado la carencia de algunos factores neurotróficos como el CNTF, BDNF y el IGF-1(82;97).

La presencia de biomarcadores de apoptosis en las motoneuronas tanto en modelos animales como en enfermos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (98) y la demostración de la activación de caspasas, y de la participación de otros derivados de la familia Bcl-2 con función pro-apoptótica en la muerte de las motoneuronas de Esclerosis Lateral Amiotrófica (99), permiten asegurar que el proceso de muerte celular en las motoneuronas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica es por apoptosis.

2. 4. 3 Terapias vigentes en Esclerosis Lateral Amiotrófica

El manejo terapéutico de los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica es complejo y demanda la participación multidisciplinaria de neurólogos, fisioterapeutas, médicos de familia y especialistas en cuidados paliativos (82). Aunque la Esclerosis Lateral Amiotrófica carece de una terapia efectiva, los síntomas que aparecen en el curso de la misma (calambres, espasticidad, salivación, espasmo laríngeo, labilidad emocional, depresión, disartria, insomnio, ansiedad, y fatiga, entre otros) pueden ser tratados. A pesar de todo lo que se conoce de la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica y de que numerosos estudios clínicos se han realizado para evaluar la efectividad terapéutica de drogas neuroprotectoras, el riluzole es la única droga aprobada para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (100). El riluzole inhibe la liberación de glutamato de las terminales pre-sinápticas e incrementa su recaptación extracelular (5). El tratamiento con riluzole durante 18 meses solo incrementó la supervivencia en un periodo de 2-3 meses (101).

Cerca de 100 agentes con propiedades neuroprotectoras se han evaluado en modelos experimentales de Esclerosis Lateral Amiotrófica y en estudios clínicos fase II y III, pero los resultados en términos de eficacia no son concluyentes (82). Entre los productos evaluados está el antibiótico beta-lactámico ceftriazone, que estimula la expresión del transportador de glutamato (GLT1 o EAAT2) (102), el antagonista no competitivo del receptor de glutamato (AMPA) talampanel (103), el inhibidor de caspasas minociclina (104) y los factores de crecimiento, como el IGF-1 recombinante (105) entre otros muchos (82;106). La terapia génica, el uso del RNA de interferencia y el trasplante de células madres como alternativas terapéuticas en Esclerosis Lateral Amiotrófica, son aproximaciones terapéuticas promisorias pero aún en fase de investigación (107).

2. 4. 4 Experiencias preclínicas en Cuba

En Cuba se ha caracterizado el comportamiento epidemiológico de la enfermedad y se ha demostrado una menor incidencia de esta en comparación a otros países, lo que sugiere que la mezcla de razas característica de la población cubana confiere cierta protección (80). Esto constituye un excelente sustrato para el abordaje farmacogenómico de la Esclerosis Lateral Amiotrófica en Cuba, en un futuro cercano.

2. 5 Esclerosis Múltiple

2. 5. 1 Epidemiología de la Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es la enfermedad neurológica más frecuente en adultos jóvenes (108), afecta millones de pacientes en todo el mundo y esta cifra continúa en ascenso (109). La Esclerosis Múltiple tiene una distribución geográfica característica porque la incidencia y la prevalencia son mayores en los lugares más distantes de las latitudes ecuatoriales (110).

2. 5. 2 Fisiopatología de la Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple tiene una base genética muy compleja. Los estudios genéticos con tecnología de alto flujo han identificado polimorfismos en la región del antígeno leucocitario humano (HLA) como el *locus* de mayor susceptibilidad para Esclerosis Múltiple (111). En los estudios de asociación de polimorfismos de simple nucleótidos se

ha descrito una asociación entre los alelos HLA-DRB1*1501 y TNF α -308 G/A, lo cual sustenta, como elemento patogénico de la Esclerosis Múltiple, la relación entre los productos de estos genes (112). Los factores ambientales por su parte, tienen una contribución importante en la patogénesis de Esclerosis Múltiple, las infecciones virales por herpes virus, coronavirus y retrovirus han sido asociadas al desarrollo de la Esclerosis Múltiple (113). La infección por el virus Epstein-Barr, que es selectiva a las células de la barrera hematoencefálica, incrementa la producción de mediadores inflamatorios que facilitan la adherencia de las células inmunocompetentes activadas y su paso al parénquima cerebral donde reconocen determinados antígenos, se activan y desencadenan la respuesta inflamatoria (114). La hipótesis más aceptada en la patogénesis de la Esclerosis Múltiple es la que la relaciona con la autoinmunidad, en la cual las células T específicas para la mielina, los linfocitos Th1 y Th17 (115-117), las células B (118), las células de la respuesta inmune innata (119) y sus correspondientes citocinas (116;117;120) tienen un rol central en la neuroinflamación y la progresión de la desmielinización. Las células de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, una vez en el parénquima cerebral y luego de una segunda activación mediada por el reconocimiento de sus antígenos específicos, expuestos en las microglías, comienzan a secretar citocinas inflamatorias como interferón gamma (IFN γ), TNF α e interleucina 1- β (121). Por otra parte, la interacción de quimocinas como el factor inducible por IFN γ (IP-10) y monocina inducible por IFN γ (Mig) con su receptor (CXCR3) contribuyen a un reclutamiento adicional de células inflamatorias hacia los tejidos neurales (122). Esta cascada de quimocinas y citocinas inflamatorias producen una sobre-expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, activación reactiva del endotelio, secreción de metaloproteinasas y pérdida de elementos de unión intercelulares como la ocludina E y la caderina del endotelio vascular (123). Las metaloproteinasas son un grupo de enzimas endopeptidasas que degradan las macromoléculas de la matriz extracelular, favoreciendo la migración y el reclutamiento de otras células inmunocompetentes hacia el parénquima cerebral donde se perpetúa la reacción inflamatoria (124).

Contrario al criterio de la desmielinización de causa autoinmune, hay evidencias recientes que sugieren otras causas de desmielinización; una afectación primaria en los

oligodendrocitos u oligodendropatía (125), y un déficit de neuroesteroides que produce un proceso de mielinización defectuoso (126), de manera que en ambos casos las reacciones inmunes son un evento secundario en el curso de Esclerosis Múltiple (125;126).

El estrés oxidativo y la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno contribuyen en la patogénesis de Esclerosis Múltiple en términos de desarrollo y de persistencia de las lesiones en el tejido nervioso (127). Adicionalmente, las neuronas de pacientes con Esclerosis Múltiple tienen deficiencias en la respiración celular debido a mutaciones inducidas por el proceso inflamatorio en el DNA mitocondrial (128).

2. 5. 3 Terapias vigentes en la Esclerosis Múltiple

Durante los años correspondientes a la década del 1990, solo el uso de los esteroides y los inmunosupresores formaban parte del tratamiento para Esclerosis Múltiple (129). Posteriormente, en 1993 con el advenimiento del primero de los agentes terapéuticos que modifican el curso de la enfermedad, el interferón beta (IFN β) 1-b (130), y unos años mas tarde el IFN β 1-a (131), comienza una nueva era en las aproximaciones terapéuticas para esta enfermedad, pues se dejó de tratar de manera sintomática para intentar incidir y modificar la evolución clínica de la enfermedad. Dentro de las propiedades inmunomoduladoras del IFN β está la capacidad de inhibir la síntesis de IFN γ , de aumentar las poblaciones de células regulatorias naturales y disminuir las células citotóxicas (132), otros efectos son la disminución de la acción tóxica del TNF α sobre los oligodendrocitos y microglías (133) y la inhibición de la expresión del MHC clase II y de las moléculas co-estimuladoras en la superficie de las células presentadoras de antígenos (134;135). El IFN β 1-b ha resultado efectivo, tolerable y con pocos efectos adversos (136).

El acetato de glatiramer, ó Copaxone ó Cop-1, conocido también por Copolímero 1 es una mezcla de polipéptidos sintéticos de cuatro aminoácidos: L-alanina, L-ácido glutámico, L-lisina y L-tirosina. El Copaxone tiene entre sus mecanismos de acción producir un cambio o desviación hacia un perfil de citocinas Th2, mediado por su naturaleza de ligando peptídico alterado y por modificar las propiedades de las células presentadoras de antígeno (137;138). Otras propiedades de esta molécula son la de

inducir células con función reguladora ($CD8^+$ y $CD4CD25^+$) antígeno-específicas (139-141) y la de interferir con la activación de linfocitos T, por competencia con la proteína básica de la mielina a nivel del MHC clase II (142). Los estudios clínicos con copaxone han demostrado alguna eficacia terapéutica así como reducción de los niveles de citocinas inflamatorias (120) y de radicales libres (143).

El natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce la cadena alfa 4 de la integrina $\alpha 4\beta 1$ ó VLA-4 la cual se expresa en los linfocitos y es un mediador del fenómeno de migración transendotelial (144). Las observaciones preclínicas en animales con EAE demostraron que al impedir la entrada de células inflamatorias hacia el parénquima cerebral, se podía prevenir la formación de nuevas lesiones inflamatorias y desmielinizantes en el sistema nervioso (145;146). Varios estudios clínicos se han realizado con el natalizumab demostrándose una reducción en la aparición de nuevas lesiones, en el número de exacerbaciones o brotes clínicos y una mejoría clínica (147-149). A pesar de su resultado en la clínica, se ha recomendado vigilar posibles efectos adversos por el riesgo de leucoencefalitis multifocal progresiva (150) lo cual sugiere que el bloqueo a largo plazo de las integrinas $\alpha 4\beta 1$, pone en peligro la eficiencia de los mecanismos de vigilancia inmunológica sistémica y a nivel del sistema nervioso.

Las estatinas o inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa son un conjunto de drogas que reducen los niveles séricos de colesterol y sus esteroides. Recientemente se ha demostrado que mejoran las funciones del endotelio vascular, atenúan los procesos inflamatorios, y disminuyen el efecto del estrés oxidativo (151). Algunas evidencias experimentales indican que las estatinas reducen la actividad de los receptores neuronales para el glutamato, y por tanto protegen a las neuronas del daño tóxico excitatorio que produce este metabolito (152). Los experimentos preclínicos y los estudios clínicos preliminares demostraron un efecto beneficioso, sin embargo en estudios clínicos aleatorizados y controlados no se demostró eficacia terapéutica con el uso de las estatinas en Esclerosis Múltiple (153).

El mitoxantrone es un antineoplásico derivado de la antracenediona, que posee propiedades inmunosupresoras, por lo que ha sido aprobado su uso en formas clínicas severas de Esclerosis Múltiple (154). Los estudios clínicos con esta droga en pacientes tratados con $IFN\beta$ que habían empeorado sus síntomas demuestran resultados

alentadores: en el 70% de los casos se redujo el deterioro neurológico, el número de exacerbaciones y la enfermedad no progresó respecto al grupo no tratado (155).

Aunque para la Esclerosis Múltiple existen numerosas alternativas terapéuticas tanto sintomáticas como de drogas que modifican el curso de la enfermedad, aún es necesario el desarrollo de aproximaciones terapéuticas dirigidas a bloquear los elementos fisiopatológicos de esta enfermedad, a proteger los blancos de la respuesta inmune inflamatoria y a facilitar los eventos de restauración o regeneración de las células dañadas (3;125).

2. 5. 4 Experiencias preclínicas en Cuba

Basado en las evidencias de que el IFN β y el IFN α comparten el mismo receptor (156), investigadores cubanos han demostrado efectos terapéuticos del IFN α en modelos *in vitro* e *in vivo* de Esclerosis Múltiple así como en estudios clínicos (156;157). Además, se ha investigado el efecto neuroprotector de la C-ficocianina en EAE con resultados satisfactorios (158).

2. 6 Isquemia Cerebral

2. 6. 1 Epidemiología de la isquemia cerebral

La enfermedad cerebro-vascular es una condición devastadora que afecta anualmente 15 millones de personas en todo el mundo y es la primera causa de discapacidad en los adultos en países industrializados. Tres meses después del episodio isquémico, del 15-30% de los sobrevivientes permanecen totalmente discapacitados y de ellos un 20% demanda cuidados en instituciones hospitalarias (159). En Cuba las enfermedades cerebro vasculares del tipo isquémico constituyen la tercera causa de muerte (160;161).

2. 6. 2 Fisiopatología de la isquemia cerebral

El 85% de los casos de enfermedad cerebrovascular son de naturaleza isquémica, el resto es de causa hemorrágica (162). La causa más común de la enfermedad cerebrovascular isquémica es la oclusión brusca de una de las arterias del cuello o del interior del cráneo, lo cual resulta en una pérdida inmediata de la disponibilidad de oxígeno y glucosa para el tejido cerebral. La isquemia cerebral desencadena reacciones

patológicas que constituyen la cascada isquémica y que culmina con la muerte celular en la zona más afectada por la isquemia en los primeros minutos que siguen al episodio isquémico (159).

Los eventos moleculares y bioquímicos que ocurren en el núcleo isquémico producen un daño celular irreversible. El área que rodea el núcleo isquémico se conoce como zona de penumbra isquémica, este territorio es potencialmente salvable con alguna intervención farmacológica (163), de lo contrario los eventos que ocurren en el núcleo isquémico repercutirán en esta zona produciendo muerte celular de neuronas y glías (164).

La muerte celular que se produce durante el daño cerebral isquémico es consecuencia de varios mecanismos: excitotoxicidad, estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y la activación del proceso de apoptosis o similar a la apoptosis (6). Estos mecanismos tienen elementos patogénicos comunes que se superponen y producen daño en neuronas, glías, y elementos vasculares. Al nivel subcelular estos mecanismos afectan la función de las mitocondrias, del núcleo, de las membranas celulares del retículo endoplásmico y de los lisosomas (165).

La privación absoluta de oxígeno y glucosa al tejido neuronal activa varias cascadas patológicas que conducen a la muerte neuronal, particularmente en la zona de penumbra. Entre estas vías están la sobre-activación de receptores de glutamato, la acumulación intracelular de iones calcio, el reclutamiento de células inflamatorias, el aumento de la producción de radicales libres y la apoptosis (166).

El fallo energético y la consiguiente despolarización de la membrana neuronal condicionan una liberación excesiva de glutamato y de otros aminoácidos excitatorios. La activación de los receptores post-sinápticos como el NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico) y receptores metabotrópicos, provoca un influjo de calcio, sodio y agua hacia el interior de las células. Todo esto conlleva la formación de edema citotóxico y a la activación enzimática mediada por calcio, que finalmente conducen al daño y la muerte celular (167).

En la isquemia cerebral la formación de especies reactivas del oxígeno sobrepasa la capacidad antioxidante fisiológica de las neuronas, provocando daño en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (168). En las neuronas, las especies reactivas del oxígeno responsables del estrés oxidativo son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo

($\cdot\text{OH}$), el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y otras, que aunque no son radicales libres, son muy tóxicas (peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peroxinitrito (ONOO^-) (169;170). La sobreproducción de especies reactivas del oxígeno también produce peroxidación lipídica (171).

La contribución de la apoptosis como mecanismo de muerte celular en la isquemia cerebral focal (172) se demuestra por hallazgos como condensación uniforme de la cromatina, presencia de cuerpos apoptóticos, contracción del citoplasma (no eosinofílico), activación de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl (Bax, Bad), activación de caspasas (173), unión extracelular de anexina V (174), y liberación de citocromo c al citoplasma (175). La apoptosis se produce por mediación de las caspasas como moléculas efectoras y por la activación de los polímeros de poli-ADP-ribosa (175).

Durante la isquemia también se afectan las células de la glía. De hecho, el edema en los astrocitos es el primer cambio observable y es uno de los factores responsables de la reducción en la recaptación de glutamato (176). En un ambiente isquémico los astrocitos producen citocinas inflamatorias, mediadores tóxicos y liberan glutamato (177). La microglia también contribuye al daño tisular isquémico por mecanismos como la producción de citocinas, óxido nítrico y otros radicales libres (164).

La necrosis producida luego del daño isquémico provoca una fuerte y rápida activación de citocinas inflamatorias como el $\text{TNF}\alpha$ y la Interleucina-8 (178). Estas últimas inducen una reacción inflamatoria con liberación de las moléculas de adhesión responsables de la agregación leucocitaria y su posterior migración a través de la pared vascular (167). Además, la isquemia induce una expresión rápida de moléculas como las metaloproteinasas, que facilitan la penetración de los leucocitos a través de la barrera hematoencefálica (179).

2. 6. 3 Terapias vigentes en enfermedad cerebrovascular isquémica

El objetivo de la neuroprotección en isquemia cerebral es preservar la viabilidad de las células en la zona de penumbra isquémica y limitar la extensión del daño irreversible.

Atenuar el daño cerebral que sigue al evento isquémico es un reto difícil de solucionar.

Para el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular isquémica existen dos estrategias, una dirigida a la revascularización con el uso de agentes trombolíticos y antiagregantes y

la otra es una estrategia de neuroprotección con drogas que preserven las neuronas y glías (180).

Relacionado con la primera estrategia, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) es la única droga aprobada para el tratamiento clínico (181). Por su estrecha ventana de efectividad terapéutica el t-PA solo es administrado al 4-5 % de los pacientes que requieren una intervención revascularizadora (182). El tratamiento con t-PA es beneficioso en términos de trombolisis, pero tiene como efecto adverso los accidentes vasculares hemorrágicos (181), lo cual también limita su uso terapéutico. Otro trombolítico, el desmoteplase, de alta afinidad por la fibrina, con menos reacciones adversas y una ventana terapéutica mayor que la del t-PA, está en desarrollo con resultados no concluyentes en estudios clínicos (183). En los tratamientos antitrombóticos, los anticoagulantes (heparina sódica y la heparina de bajo peso molecular) se recomiendan generalmente para el ictus cardioembólico, mientras que los antiagregantes (ácido acetil salicílico, clopidogrel, dipyridamol) se aplican en el ictus aterotrombótico (184). Estos agentes protegen el cerebro a través de su efecto en la hemodinámica y no por modificar mecanismos metabólicos (11).

Se han descrito aproximadamente 160 estudios clínicos para evaluar una gran variedad de estrategias neuroprotectoras en enfermedad cerebrovascular isquémica (Anexo. B), de ellos el 75 % han sido concluidos o abandonados prematuramente y solo el 25 % está aun en curso (11).

2. 6. 3. 1 Estrategias neuroprotectoras evaluadas en clínica

2. 6. 3. 1. 1 Bloqueadores de canales de calcio: Nimodipina

El calcio desempeña un rol importante en la patología del daño cerebral isquémico (185). Los antagonistas de calcio, como la nimodipina, bloquean selectivamente los canales de calcio de lenta activación, reducen la entrada de calcio en las neuronas y con ello producen un efecto beneficioso en neuronas sometidas a isquemia. Las evidencias preclínicas en modelos de isquemia cerebral focal con este antagonista de calcio demostraron resultados satisfactorios cuando la administración del medicamento se efectuó a los 15 minutos de la isquemia y resultados no satisfactorios con administración en periodos de una hora o más posterior al episodio isquémico (186). Cerca de 7000

pacientes se han incluido en un total 28 estudios clínicos para evaluar la efectividad terapéutica de la nimodipina en cuanto a dosis, tiempo y vías de administración. Los resultados de los estudios preclínicos y los estudios clínicos han sido inconsistentes en término de neuroprotección (186;187).

2. 6. 3. 1. 2 Antagonistas del glutamato

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más relevante del sistema nervioso, en condiciones de isquemia induce daño por excitotoxicidad (188). El glutamato interacciona con los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y el ácido propiónico 3-hidroxi-5metil-4-isoxalazole (AMPA), que son relevantes en neuroprotección. Las estrategias neuroprotectoras dirigidas a bloquear la entrada del glutamato comprenden antagonistas del NMDA, competitivos (Selfotel) (189) y no competitivos (disolcipine, dextrometorfan y aptiganel) (190), antagonistas del NMDA específicos por el sitio de la glicina (Gavestinel) (191) y antagonistas del receptor AMPA (ZK 200755) (192). Los estudios clínicos con estos agentes fueron detenidos en la fase piloto (193;194), abandonados por la aparición efectos adversos graves o por la elevada mortalidad (195;196) y por carencia de eficacia terapéutica (197).

2. 6. 3. 1. 3 Agonistas del receptor del GABA

El ácido gamma amino butírico (GABA), es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia. El clometiazole potencia el efecto del GABA por su efecto agonista en el receptor GABA(A) (198). Los estudios preclínicos de este agonista del GABA evidenciaron que su efecto protector estaba asociado a una administración inmediata después del reto isquémico (199). En los estudios clínicos la administración del clometiazole fue 12 horas posteriores al evento isquémico y no demostró eficacia terapéutica (200).

2. 6. 3. 1. 4 Magnesio

El magnesio puede considerarse como un antagonista endógeno del calcio, que puede proteger por diversos mecanismos que incluyen el bloqueo de los receptores NMDA, la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios, el bloqueo de canales de calcio y la relajación del músculo liso vascular (201). Los experimentos realizados en modelos animales revelaron al magnesio como un neuroprotector débil. En el estudio

clínico que evaluó el magnesio en términos de mejorar supervivencia o reducción de discapacidad no se demostró efectividad terapéutica e incluso la mortalidad fue mayor en el grupo que se trató con magnesio (202).

2. 6. 3. 1. 5 Los antioxidantes

Los antioxidantes son otro grupo de drogas que se han usado como neuroprotectores. El NXY-059 es un atrapador de radicales libre que se evaluó en modelos de isquemia focal permanente y transitoria en especies roedoras y en primates no humanos y sus resultados beneficiosos se comprobaron en más de un laboratorio. La evaluación del NXY-059 cumplió satisfactoriamente con las guías de procedimientos para la evaluación preclínica de candidatos neuroprotectores, establecidas por el consorcio industrial y académico para la terapia de enfermedad cerebrovascular (203). Sin embargo, los resultados de los estudios clínicos no fueron satisfactorios debido al perfil bioquímico de este agente, caracterizado por la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la poca penetración en las células, y su escaso potencial redox. Al fracaso de los estudios clínicos también contribuyó que el tiempo de administración fue mayor al que se había demostrado experimentalmente (11). El mesilato de tirilazad (U-74006F), otro antioxidante de tipo amino-esteroide inhibidor del proceso de peroxidación lipídica dependiente de hierro, fue evaluado en preclínica y posteriormente en clínica el estudio fue abandonado por falta de efectividad (204). El ebselen es un compuesto de selenio con actividad similar a la enzima glutatión-peroxidasa que inhibe adicionalmente el peroxinitrito. En un estudio clínico controlado y enmascarado con 105 pacientes, este agente demostró reducir el volumen de infarto acompañado de una mejoría clínica solo en los pacientes que recibieron el tratamiento en las 6 primeras horas posterior a la isquemia (205). El agente antioxidante edaravone (MCI-186) es un colector de radicales de oxígeno y bloquea el proceso de peroxidación lipídica, fue evaluado con resultados satisfactorios en modelos de isquemia cerebral global y focal. El estudio clínico fase II con edaravone se realizó administrando el medicamento en un periodo de hasta 72 horas posterior al episodio isquémico, este estudio evidenció una mejoría clínica a los tres meses según la escala modificada de Rankin (206).

2. 6. 3. 1. 6 Precusores de fosfolípidos: citicolina

La citicolina (citidina 5-difosfolina) es el producto limitante en la síntesis de fosfatidilcolina a partir de colina. Se administra por vía oral, se hidroliza en citidina y colina, la cual se absorbe rápidamente (207), pasa la barrera hematoencefálica y se incorpora a la fracción de fosfolípidos de las membranas neuronales. La citicolina aumenta la síntesis e inhibe la degradación de fosfolípidos, produce la liberación de ácidos grasos, incrementa los niveles de norepinefrina y dopamina y restablece las funciones de la membrana mitocondrial y de la enzima ATP-sintasa (207;208). Los experimentos en modelos de isquemia cerebral demostraron que la protección de la citicolina depende del momento en que se inicie el tratamiento (209). Los experimentos de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media realizados por el grupo de Hurtado y colaboradores evidenciaron que el tratamiento crónico con citicolina empezando 24 horas posterior a la isquemia y sostenido hasta 28 días, produce una mejoría clínica funcional e incrementa la red dendrítica en la corteza cerebral motora, lo cual sugiere que esta modalidad de tratamiento incrementa la plasticidad neuronal en zonas no dañadas pero funcionalmente comprometidas en la conectividad de las regiones cerebrales (210). Los estudios clínicos han demostrado que la citicolina es un medicamento bien tolerado y seguro, que produce una recuperación sensorial y motora y contribuye a la neuroplasticidad (211).

2. 6. 3. 1. 7 Otros tratamientos y estrategias neuroprotectoras evaluados en estudios clínicos de isquemia cerebral

Entre las drogas neuroprotectoras que han sido evaluadas en estudios clínicos se incluyen los inhibidores de señales mediadas por el óxido nítrico (lubenizole), los inhibidores leucocitarios (enlimomab y UK 279276), los activadores de canales de potasio neuronales (BMS-204352), el gangliósido GM1, los modificadores de la fluidez de membrana (piracetan), los antagonistas opioides (nalmefene), los factores de crecimiento (factor básico de crecimiento de fibroblastos), los bloqueadores de canales de sodio (fosfopenitoina), los bloqueadores de canales de calcio (flunarizina), los vasodilatadores (pentoxifilina), y los agonistas de receptor 5HT1A de serotonina (repinotan). Entre las estrategias más prometedoras está la hipotermia, la administración

de albúmina humana a altas dosis, la hemodilución, la terapia combinada y la estimulación de mecanismos endógenos de neuroreparación (11;74).

2. 6. 4 Experiencias preclínicas en Cuba

En Cuba se han realizado varios estudios preclínicos para la evaluación de los efectos neuroprotectores de la eritropoyetina con bajo contenido de ácido siálico, cuyos resultados son promisorios para sustentar su tránsito a clínica (212) y se ha investigado sobre las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e inmunomoduladoras de un producto natural que puede ser un buen candidato en neuroprotección (213).

Recientemente se describió el efecto terapéutico beneficioso de la C-ficocianina en modelos de isquemia cerebral global (214).

2. 7 Modelos experimentales

El desarrollo de la medicina y la búsqueda de alternativas terapéuticas promisorias para el tratamiento de enfermedades incurables están muy ligados al trabajo con modelos experimentales *in vivo* que reproduzcan en parte la fisiopatología de estas enfermedades. Los científicos ingleses W. Russell y R. Burch (215) fueron pioneros en hacer valer el principio de que la excelencia científica está determinada por el uso humanitario de los animales de experimentación.

2. 7. 1 Modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica

2. 7. 1. 1 Modelos *in vitro*

Como las motoneuronas son las células más vulnerables en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (216), los modelos *in vitro* más utilizados son el cultivo primario de motoneuronas embrionarias, el cultivo órgano-típico de láminas de médula espinal de ratones recién nacidos y la línea celular similar a motoneuronas NS34 (217). Con el propósito de remedar la fisiopatología de la enfermedad, estas células se han cultivado en presencia de agentes inductores de apoptosis como la estaurosporina (218), en presencia de astrocitos reactivos (219), o en ausencia de factores tróficos imprescindibles para la viabilidad *in vitro* de las motoneuronas (220).

2. 7. 1. 2 Modelos *in vivo*

Entre los modelos *in vivo* el más usado es el ratón transgénico que sobre-expresa la superóxido dismutasa tipo 1 humana mutada (SOD1 G93A; sustitución en la glicina del codón 93 por la alanina) (221). Este modelo se generó inmediatamente después de haberse descrito la mutación en el gen SOD1 en un subgrupo de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar (83), lo cual tuvo un impacto muy relevante en la explicación de los mecanismos patogénicos de la enfermedad y facilitó el descubrimiento de numerosas mutaciones en el gen SOD1 asociadas a otros casos de Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar (221) (Anexo C).

La mutación G93A de la enzima superóxido dismutasa induce cambios conformacionales que producen agregados macromoleculares, lo cual determina que la proteína adquiere funciones tóxicas (221). Este modelo, generado en 1994 por Gurney y colaboradores (222) se convirtió en el referente principal para las evaluaciones preclínicas de las alternativas terapéuticas en Esclerosis Lateral Amiotrófica (223;224). El inconveniente principal de este modelo es que la mutación G93A solo está presente en el 2% de los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (225).

Los ratones transgénicos G93A exhiben el primer signo de la enfermedad alrededor de los 100 días de edad. Las primeras manifestaciones clínicas debidas a la debilidad muscular son un temblor fino en uno de los miembros, seguido de enlentecimiento en la marcha. Posteriormente los animales experimentan paresis o parálisis de uno de los miembros inferiores, seguido por parálisis ascendente que llega a cuadripléjia y se produce un estatus moribundo alrededor de los 120 días de edad. Los elementos patológicos más relevantes son la pérdida de motoneuronas, la astrocitosis y los agregados macromoleculares SOD1 positivos que se aprecian en las astas anteriores de la médula espinal (226) (Anexo D).

En la Esclerosis Lateral Amiotrófica cerca de 3 % de los casos de origen familiar y 1,5 % de los casos esporádicos presentan mutaciones en el gen TDP-43 (221). Esto motivó la generación de otros modelos transgénicos que sobre-expresan la proteína mutada, pero solo en ratas la mutación TDP-43 M337V reproduce el fenotipo de la enfermedad (227).

Los expertos en el tema insisten en que para avanzar en la búsqueda de alternativas terapéuticas efectivas en Esclerosis Lateral Amiotrófica es necesario la generación de otros modelos experimentales *in vivo* más representativos de la enfermedad (228).

2. 7. 2 Modelos de Esclerosis Múltiple

La encefalitis autoinmune experimental (EAE) es el modelo animal de Esclerosis Múltiple más reconocido (229). Todas las terapias disponibles para esta enfermedad han demostrado eficacia en estos modelos (230;231).

Se han desarrollado varios modelos de EAE para estudiar aspectos clínicos, etiopatogénicos y para evaluar candidatos terapéuticos (229). Todos estos modelos se han desarrollado a partir del concepto de inmunización con auto-antígenos (231), y cada uno remeda un aspecto particular de la Esclerosis Múltiple.

Entre los antígenos más usados para la inducción de EAE se encuentran el homogenizado de médula espinal; las proteínas de la mielina; los péptidos encefalitogénicos derivados de las proteínas de la mielina; y la transferencia adoptiva de células de bazo o de linfonodos de animales previamente inmunizados con alguno de los antígenos anteriormente referidos, hacia animales vírgenes (232;233). El uso de adyuvantes oleosos, el empleo de *Micobacterium tuberculosis* inactivado y la toxina de *Bordetella pertussis* ha contribuido a la reproducibilidad y a la severidad de estos modelos experimentales (233).

La EAE se puede reproducir en varias especies: en primates (234), en ratas (231), y en ratones salvajes (235) o ratones transgénicos (236;237). El desarrollo clínico de la enfermedad, así como su curso monofásico o crónico depende de la especie y del modo de inmunización (233;235;238).

El hallazgo de la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) como auto-antígeno relevante en la patogenia de la Esclerosis Múltiple permitió usar esta proteína o sus péptidos encefalitogénicos derivados para inducir la EAE (233). El MOG es el único auto-antígeno de la mielina que induce respuesta celular T y auto-anticuerpos desmielinizantes, de manera que en los animales inmunizados activamente con MOG, la combinación de mecanismos efectores, células T patogénicas y anticuerpos

desmielinizantes, reproducen la complejidad clínico-patológica de la Esclerosis Múltiple (235;238;239). Esto último acercó más el modelo de EAE a la Esclerosis Múltiple.

A pesar de que los modelos convencionales de EAE son el sistema experimental por excelencia en las investigaciones relacionadas con Esclerosis Múltiple, se han propuesto las siguientes recomendaciones dirigidas a consolidar los resultados obtenidos con el empleo de estos modelos cuando se esté evaluando un candidato terapéutico: validar el efecto terapéutico de los candidatos en más de un modelo, realizar tratamientos en período sintomático (esquemas terapéuticos), realizar registros de la evolución de la enfermedad en períodos largos (modelo crónico), trabajar con modelos que remedien los tipos de exacerbación remisión y crónicos progresivos, y generar modelos experimentales en los que se incorporen los factores de riesgo de la enfermedad en humanos (240).

2. 7. 3 Modelos de enfermedad cerebrovascular isquémica en gerbil de Mongolia

Para investigar los mecanismos fisiopatológicos que se activan en la isquemia cerebral y evaluar intervenciones neuroprotectoras así como sus mecanismos de acción se hace necesario la utilización de modelos *in vivo* que remedien sus consecuencias fisiopatológicas. Se han desarrollado numerosos modelos de isquemia global o focal, permanente o transitoria, en roedores, felinos, primates no humanos, etc. (241;242). Por razones de espacio, esta revisión solo incluye los modelos desarrollados en gerbil de Mongolia porque este animal es el que se emplea en este trabajo.

El polígono de Willis del gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) presenta una anomalía anatómica congénita que consiste en la ausencia de la arteria comunicante posterior, lo que hace que la circulación carotídea sea independiente de la vertebrobasilar (243;244). Basado en lo anterior se han generado modelos experimentales que consisten en la oclusión unilateral permanente de una de las arterias carótidas comunes (isquemia unilateral permanente) (245) y otros en los que se ocluyen ambas arterias carótidas comunes de manera temporal, por períodos de 5 hasta 20 minutos (isquemia bilateral temporal) y son considerados como modelos de isquemia reperusión (241;246;247).

En el modelo de isquemia unilateral permanente solo un 30% o 40 % de los gerbos desarrollan signos clínicos de isquemia severa, con alta mortalidad (242;248). Esto ocurre debido a la existencia de anastomosis entre las arterias cerebrales anteriores, lo cual hace que la disminución del flujo sanguíneo del lado afectado se compense con el aporte del hemisferio contralateral, por lo que no se produce infarto (243). El hecho de que no se lesionan todos los animales hace que el modelo tenga alta variabilidad.

En el modelo de isquemia bilateral transitoria, la oclusión temporal de las dos arterias carótidas comunes provoca una isquemia global del cerebro anterior (244). La severidad de los signos clínicos que acompañan este modelo es proporcional al tiempo de oclusión de las arterias carótidas comunes (249).

La isquemia cerebral global inducida con el modelo de isquemia bilateral transitoria remeda alguno de los elementos fisiopatológicos del paro cardiaco (250). Estos modelos experimentales, además de reproducir las manifestaciones clínicas e histológicas de la enfermedad cerebral isquémica, tienen otro elemento de similitud con la enfermedad humana porque la oclusión de las arterias carótidas comunes es una de las causas más frecuentes de enfermedad cerebro vascular isquémica (159).

3. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3. 1 Diseño Experimental de la tesis

Para el cumplimiento de los objetivos específicos en este trabajo de tesis se emplearon modelos experimentales que reproducen la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Capítulo 4), la Esclerosis Múltiple (Capítulo 5) y la Isquemia Cerebral (Capítulo 6). Cada uno de estos capítulos contiene secciones de materiales y métodos, resultados, discusión y resumen de resultados (Tabla 1).

Con los modelos experimentales se evaluó el efecto neuroprotector de la coadministración EGF+GHRP₆. El EGF (Heber-Biotec, Cuba) que se utilizó en los experimentos es una molécula recombinante expresada en *Saccharomyces cerevisiae*. El GHRP₆, de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, se adquirió de *Péptidos-BCN* (Barcelona, España).

El trabajo con todos los animales de experimentación se realizó siguiendo las normas éticas y de seguridad biológica de cada una de las instituciones en que se realizaron los experimentos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Prisma (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$. En lo adelante, cuando se plantea que hay diferencia, aumento, disminución, etc., es porque cumple el criterio de que es estadísticamente significativo.

Tabla 1. Diseño Experimental de la Tesis

CAPÍTULO	MODELO EXPERIMENTAL	TIPO DE DAÑO	OBJETIVO A DEMOSTRAR EN CADA EXPERIMENTO	EVALUACIONES
Neuroprotección en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica y Axonopatía Tóxica	Cultivo primario de motoneuronas embrionarias puras	Ausencia de factores tróficos	Efecto citoprotector del EGF y del GHRP ₆ sobre las motoneuronas	Supervivencia de motoneuronas
	Cultivo primario de motoneuronas embrionarias y glías	Inducción de apoptosis	Efecto citoprotector de EGF+GHRP ₆ sobre las motoneuronas y sus glías	Morfometría de motoneuronas
	Ratones transgénicos por sobre-expresión de la superóxido dismutasa humana	Genético	Efecto del tratamiento con EGF+GHRP ₆ sobre dos biomarcadores típicos de Esclerosis Lateral Amiotrófica	Expresión transcripcional de genes IGF-1 y TNF α
	Patología axonal (ratones C57BL/6)	Tóxico	Efecto terapéutico de EGF+GHRP ₆ sobre los signos y síntomas de la patología axonal	- Clínica - Conductual - Electrofisiológica
Neuroprotección en modelos de Esclerosis Múltiple	Encefalitis Autoinmune Experimental Moderada (ratas Lewis)	Autoinmune	Efecto terapéutico de EGF+GHRP ₆ sobre los signos y síntomas de la Encefalitis Autoinmune Experimental y modificación de los biomarcadores	-Clínica -Marcadores de peroxidación lipídica -Expresión transcripcional del gen IGF-1
	Encefalitis Autoinmune Experimental Severa (ratones C57BL/6)	Autoinmune	Efecto terapéutico y profiláctico de EGF+GHRP ₆ sobre los signos y síntomas de la Encefalitis Autoinmune Experimental	Clínica
Neuroprotección en modelos de Isquemia Cerebral	Isquemia Cerebral Global (ICG) Severa (gerbil de Mongolia)	Isquemia/reperfusión	Efecto terapéutico de EGF+GHRP ₆ sobre los signos y síntomas de la ICG y modificación de algunas variables morfométricas	-Clínica -Conductual -Morfométrica
	Isquemia Cerebral Global (ICG) Moderada (gerbil de Mongolia)	Isquemia/reperfusión	Efecto terapéutico de EGF+GHRP ₆ sobre los signos y síntomas de la ICG y modificación de algunas variables morfométricas	-Clínica -Conductual -Morfométrica

4. EFECTOS DEL EGF, GHRP₆ Y DE LA COMBINACIÓN EGF+GHRP₆ EN MODELOS DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA Y DE AXONOPATÍA TÓXICA COMO EJEMPLO DE ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA

4. 1 Materiales y Métodos

4. 1. 1 Efectos del EGF y del GHRP₆ en cultivo de motoneuronas embrionarias en ausencia de factores tróficos

4. 1. 1. 1 Obtención, cultivo y tratamientos de las motoneuronas embrionarias puras

Este trabajo se realizó en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay. Para la obtención de los embriones las ratas Spraguey Dowley (n=2) gestadas de 15 días se sometieron a eutanasia inducida con anestésico. Los procedimientos de disección del cordón medular en embriones de rata de 15 días y la preparación de la suspensión celular de motoneuronas puras se realizaron según lo descrito por Henderson C. E. (251).

Para la obtención de un cultivo de motoneuronas puras, a la suspensión celular anteriormente referida se le aplicó un gradiente de centrifugación en metrizamida (Serva) y posteriormente una inmuno-selección con el anticuerpo monoclonal IgG 192, específico para la proteína p75_{NTR} (receptor de neurotrofinas), realizada en placa petri. Las células que se adherieron a la placa se seleccionaron como motoneuronas puras, el resto se eliminó (251;252).

Las motoneuronas puras (en ausencia de glías) se sembraron a una densidad de 350 células / cm² en discos de vidrios de 13 mm insertados en placas de 24 pozos (p-24), previamente recubiertos con poli D-L-ornitina a 1,5 µg/ml (Sigma) y laminina a 3 µg/ml (Sigma). Las motoneuronas se cultivaron en medio Neurobasal (Gibco) suplementado con 2% de suero equino (Gibco), L-glutamato 25 mM, β-mercaptoetanol 25 µM, L-glutamina 0,5 mM, 2 % del suplemento B-27 (Gibco-Invitrogen) y estreptomycin 100 µg/ml.

El cultivo de motoneuronas se incubó durante 48 horas, en atmósfera 5 % CO₂, a 37°C. Las motoneuronas control positivo se cultivaron en presencia del factor de crecimiento nervioso derivado de glías (GDNF, 1 ng/ml). A las células del grupo control negativo no

se les adicionó ningún factor trófico. Un grupo de motoneuronas se cultivaron en presencia de EGF 100 ng/ml o de GHRP₆ 100 µg/ml, en ausencia de GDNF en ambos casos. El experimento se realizó dos veces y se hicieron duplicados de cada condición a evaluar (incluidos los controles).

Se contaron las células vivas en un área predeterminada de 0,9 cm² en placas de 24 pozos empleando un microscopio de contraste de fase. Como células vivas se consideraron las que exhibían neuritas intactas y más largas que la longitud resultante del diámetro de 4 somas (219).

Los datos analizados corresponden al porcentaje de las células vivas de dos experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de X² de comparación de porcentajes y la prueba de Fisher.

4. 1. 2 Efectos del EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆ en un cultivo mixto de motoneuronas embrionarias expuestas a un agente inductor de apoptosis

4. 1. 2. 1 Obtención, cultivo y tratamientos de las motoneuronas embrionarias y glías

Este experimento se realizó en el Instituto de Neurología del Colegio Universitario de Londres. Para la obtención de los cordones medulares y la preparación de la suspensión celular se siguió el protocolo descrito por Camu W. y Henderson C. E. (253). Las células obtenidas mediante este procedimiento se resuspendieron en medio Neurobasal completo (Gibco), el cual contenía suplemento B-27 al 2 %, suero equino 2 %, glutamina 0,5 mM, β-mercaptoetanol 12,5 µM y 5 µg/ml de penicilina-estreptomicina. El medio de cultivo se enriqueció adicionalmente con los factores de crecimiento nervioso derivado de las glías 1 pg/ml (GDNF), factor neurotrófico ciliar 5 pg/ml (CNTF) y factor de crecimiento derivado de cerebro 1 pg/ml (BDNF) todo procedente de R & D Systems.

Las células se sembraron a razón de 5 x 10⁴ células por pozo, en p-24 sobre discos de vidrio de 13 mm previamente recubiertos con poli D-L-ornitina a 1,5 µg/ml (Sigma) y laminina a 3 µg/ml (Sigma). Las células se incubaron en ambiente de 5 % de CO₂ a 37°C durante 7 días previo a cualquier tratamiento. El medio de cultivo se renovó en dos ocasiones.

El cultivo mixto de motoneuronas y glías procedente de las astas anteriores de la médula, cultivadas durante 7 días se expuso al agente inductor de apoptosis estaurosporina (10 µg/ ml) (STU), alcaloide derivado de bacterias *Streptomyces staurosporeus* (254). De manera concomitante al medio de cultivo se le aplicaron diferentes tratamientos: EGF 20 ng/ml, GHRP₆ 10 µg/ml, la combinación de estos o 10 µM de arimoclomol (CytRx Corporation) como un control positivo de referencia. Como control negativo se utilizó un grupo de células a las cuales solo se les adicionó la STU; como control positivo quedaron células a las que no se les adicionó nada. A partir de la aplicación de los diferentes tratamientos todos los cultivos se incubaron por 8 horas. Cada condición a evaluar se trabajó con dos réplicas. Pasado el tiempo de incubación, las células se fijaron en paraformaldehído 4 % durante 20 minutos; y se lavaron 3 veces con PBS.

4. 1. 2. 2 Inmunocitoquímica para la identificación de motoneuronas

El reconocimiento con el anticuerpo específico para la proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) permite la identificación de las motoneuronas (soma, dendritas y axones) con respecto a las células de la glía (218).

Las células se incubaron por 5 minutos con PBS-Triton X-100 1%. Se realizó el bloqueo inespecífico incubando las células en una solución de PBS-Triton X-100 1%-suero de cabra 3 %. El anticuerpo primario que reconoce la proteína MAP-2 (MAP-2, Sigma), generado en conejos, se utilizó a una dilución 1:1000 y se incubó toda la noche. Seguidamente se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron las células con un anticuerpo secundario generado en cabras, biotinilado, que reconoce inmunoglobulinas de conejo. Luego de los tres lavados con PBS se aplicó una solución preparada con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (método Vectastain) (255), la cual se incubó durante una hora, seguida de tres lavados con PBS. Finalmente se adicionó diaminobenzidina 0,7 mg/ml (Fast DAB, Sigma) y se incubaron las células por 3 minutos, pasados los cuales se lavaron nuevamente tres veces con PBS. Posteriormente se sometieron a un proceso de deshidratación en etanol 70 %, etanol 90 % y etanol 100 %, durante 30 segundos cada uno. Los discos de vidrio se extrajeron de las placas de 24 pozos, se rotularon y se montaron en portaobjetos con cubreobjetos.

Las células MAP-2 positivas se reconocen porque exhiben una coloración marrón.

4. 1. 2. 3 Análisis morfométrico

Para evaluar el efecto del EGF y del GHRP₆, y de la combinación de ambos en el cultivo mixto de motoneuronas expuestas a estaurosporina se digitalizaron 33 campos en cada disco de vidrio correspondiente a cada grupo experimental. Para la toma de las imágenes se trazaron dos líneas a lo largo de cada uno de los ejes mayores de los discos que contenían las células marcadas. Sobre estas líneas se digitalizaron alternativamente las imágenes a una magnificación de 40x, empleando un microscopio óptico (Carl Zeiss, modelo Axiostar plus). El área de cada imagen fue de 5590 μm^2 . Se calculó la fracción del área que ocupan las motoneuronas MAP-2 positivas con respecto al área total de la imagen. Para la determinación de la fracción de área de las motoneuronas MAP-2 positivas se utilizaron las herramientas del programa *ImageJ* (256). Una vez que se determinó la fracción de área en cada uno de los 33 campos digitalizados de cada grupo experimental, se calculó una mediana la cual fue utilizada para el análisis estadístico.

4. 1. 2. 4 Análisis estadístico

Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn.

4. 1. 3 Efecto de la co-administración de EGF+GHRP₆ en animales transgénicos que sobre-expresan el gen de la superóxido dismutasa humana (Tg SOD1 G93A)

4. 1. 3 .1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones transgénicos que sobre-expresan el gen de la enzima superóxido dismutasa humana-1 mutada; B6SJL-TgN (SOD1-G93A) (257) y ratones no transgénicos procedentes de los mismos parentales. Este experimento se realizó en el Centro de Biología Molecular de Turín, Italia.

4. 1. 3. 2 Esquema de tratamiento

Los ratones transgénicos de 4 semanas (en período pre-sintomático) se inyectaron por vía intraperitoneal durante 30 días consecutivos con la combinación EGF 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

+GHRP₆ 600 µg/kg (grupo de tratamiento, n=4) y con solución salina fisiológica (grupo control de vehículo, n=3). Un grupo de ratones no transgénicos, pero con el mismo fondo genético se utilizó como control de animales sanos (grupo control sano, n=3).

4. 1. 3. 3 Determinación de la expresión cuantitativa de los genes IGF-1 y TNF α en la médula espinal

Al final del período de tratamiento los animales se anestesiaron profundamente con una mezcla de oxígeno e isoflurano y se sacrificaron. Se obtuvieron muestras de médula espinal para extraer RNA total por el método *Purelink Micro-to-Mide Total RNA Purification System* (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para eliminar las posibles contaminaciones con DNA cromosomal las muestras de RNA se trataron previamente con la enzima DNase I (Invitrogen). Del RNA total se usaron 125 ng para el proceso de transcripción inversa, usando la enzima reverso transcriptasa de alta capacidad (RT High Capacity kit, Applied Biosystems). La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó con el sistema *ABI Prism 7300 real-time PCR* (Applied Biosystems) usando la mezcla *Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG* con ROX (Invitrogen), en un volumen total de 20 µl. Los transcritos de TNF α e IGF-1 se detectaron usando la biblioteca universal de oligonucleótidos (Roche). Para el gen del TNF α las secuencias de los oligonucleótidos murinos fueron: TNF α (sentido: TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG); (antisentido: GGT CTG GGC CAT AGA ACT GA). Para el gen del IGF-1 las secuencias de los oligonucleótidos murinos fueron: (sentido: TCGGCCTCATAGTACCCACT); (antisentido: ACG ACA TGA TGT GTA TCT TTA TTG C). Los resultados se analizaron con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (258) usando como control interno de expresión constitutiva el gen 18S rRNA generado para el sistema *Taqman* (Applied Biosystem). Cada muestra fue procesada por triplicado. Los valores obtenidos de TNF α e IGF-1 en unidades arbitrarias, se expresaron en porcentajes con respecto a los valores de los ratones no transgénicos (controles sanos) y se calculó el porcentaje de cambio de los transcritos IGF-1 y TNF α en el grupo tratado con la combinación EGF+GHRP₆ con respecto al grupo vehículo (259). También se estableció un índice IGF-1/TNF α .

4. 1. 4 Efectos del EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆ en un modelo de patología axonal inducida con 1,2 diacetilbenceno

4. 1. 4. 1 Animales de experimentación

Este experimento se realizó en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Habana, Cuba) Se emplearon ratones hembras de la cepa C57BL/6 (19 ± 1 g de peso corporal), procedentes del CENPALAB (Habana, Cuba). Estos se mantuvieron previamente en el bioterio del CIGB, y una semana antes de los experimentos los animales se adaptaron a las condiciones del laboratorio (60% de humedad, ciclo luz-oscuridad 12 x12, y $25 \pm 1^\circ\text{C}$). Se colocaron 5 animales por caja, con libre acceso a comida y agua.

4. 1. 4. 2 Generación del modelo de patología axonal por intoxicación con 1,2 diacetilbenceno (1,2 DAB).

El 1,2 DAB (Fluka) se preparó disolviéndolo en una solución de acetona al 2% en solución salina (vehículo) (260). Los animales se inyectaron con dosis diarias de 30 mg/kg de 1,2 DAB durante 45 días (Fig.1). Un grupo control sano recibió solo la inyección de solución de acetona al 2% en solución salina.

4. 1. 4. 3 Esquema de tratamiento

El EGF y el GHRP₆ se diluyeron en solución salina estéril inmediatamente antes de su administración. 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$), GHRP₆ (660 $\mu\text{g}/\text{kg}$), EGF+GHRP₆ (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 660 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y solución salina (grupo control de vehículo). Luego de finalizada la administración de 1,2 DAB los tratamientos se aplicaron diariamente por vía intraperitoneal durante un período de 20 días (Fig.1).

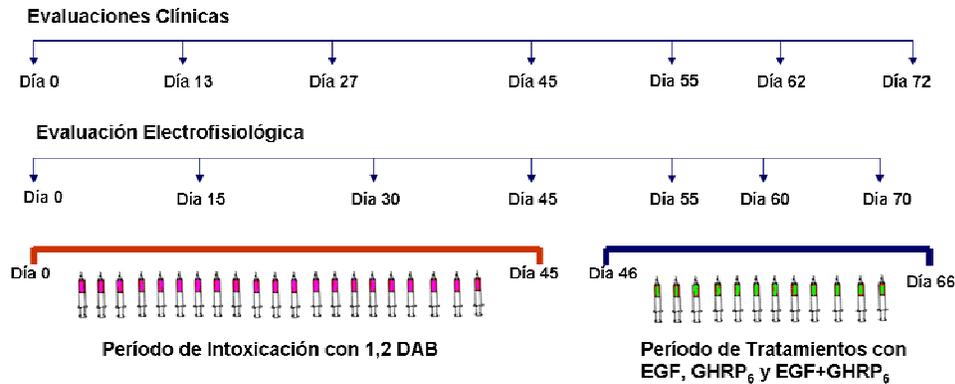


Figura 1. Esquema del modelo de inducción de patología axonal y de tratamiento con EGF, GHRP₆ y EGF+GHRP₆. Las evaluaciones clínicas y electrofisiológicas se realizaron en el período de intoxicación con el 1,2 DAB y en el período de tratamiento.

4. 1. 4. 4 Evaluación clínica

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 (261;262).

Todos los experimentos conductuales se realizaron por dos observadores entrenados no informados de los tratamientos aplicados a los diferentes grupos.

La prueba de la suspensión en rejilla mide la capacidad para mantenerse suspendido de una rejilla de alambre durante un minuto. La prueba del trapecio evalúa la fuerza de agarre de acuerdo con el tiempo que el animal es capaz de colgarse con sus patas anteriores de un alambre. Esta prueba tiene dos modalidades: el reflejo prensil y la capacidad de tracción del tren posterior del animal. Para el primero se consideró la capacidad de los animales de permanecer suspendidos por sus dos patas anteriores a una barra horizontal durante 1 minuto o hasta su caída; en el segundo caso se evaluó el tiempo en que las patas traseras alcanzan la barra (262).

El desplazamiento motor espontáneo se evaluó en un campo abierto (jaula de plexiglás de 30 x 9 x 15 cm, con el piso subdividido en 9 cuadrados). Después de 2 minutos de adaptación, a cada animal se le permitió moverse libremente durante 1 minuto. Se registraron el número de empinamientos y los cambios de cuadrado (261).

El reflejo de extensión de las extremidades traseras, que es una postura que adoptan los ratones cuando se suspenden por la cola, se evaluó de la forma siguiente: ausencia total

del reflejo; presencia del reflejo extensor en una sola extremidad o en ambas extremidades sin separación de los dedos y reflejo extensor normal con separación de los dedos. A lo anterior se le asignó una puntuación de cero, uno y dos respectivamente (263).

El patrón de la marcha se analizó para estimar la función de los nervios periféricos. Para ello los animales se inmovilizaron manualmente y sus patas se pintaron con una tinta no tóxica. Seguidamente se les permitió caminar sobre un papel blanco dentro de un corredor restringido (40 x 7 x 10 cm). Se midió la longitud del paso (distancia entre las huellas consecutivas de una misma pata); el ancho de la



huellas consecutivas de una misma pata); el ancho de la marcha –*gait width*, en inglés- (longitud de la base del triángulo formado entre las huellas de las patas derecha e izquierda); y la longitud entre los pasos (distancia entre las huellas alternas de las patas derecha e izquierda), tal como fue descrito por Jaworski y colaboradores (264) (Fig.2).

Figura 2: Representación de las variables longitud del paso, ancho de la marcha y longitud entre los pasos.

4. 1. 4. 5 Evaluación de los parámetros electrofisiológicos

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. Como electrodos de registro positivo y de referencia se emplearon agujas 28G. El primero se insertó en los músculos de la pierna, en un punto medio entre la rodilla y el tobillo, y el segundo en la piel de la membrana interdigital como sitio eléctricamente indiferente. Para la estimulación eléctrica se emplearon dos electrodos de pinzas con el objetivo de fijarlos a la piel en el

área de estimulación. Para la estimulación los electrodos se colocaron cerca de las vértebras, uno a cada lado de la columna vertebral, 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 (estimulación supra máxima). 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).

4. 1. 4. 6 Ultraestructura

Al final del periodo de intoxicación con 1,2 DAB, se tomaron muestras de tejido del asta anterior de la médula espinal en la región lumbar y del nervio ciático en la región más proximal a la médula. Las muestras se procesaron para microscopía electrónica de transmisión. Los cortes ultrafinos de (40 y 50 nm) se examinaron en un microscopio (JEOL JEM 2000 EX).

4. 1. 4. 7 Análisis estadístico

Se utilizaron las pruebas U de Mann-Whitney y t de Student para las comparaciones entre los grupos enfermos con 1,2 DAB y controles sanos. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Para la evaluación de la recuperación se hizo un análisis de regresión.

4. 2 Resultados

4. 2. 1 Efectos del EGF y del GHRP₆ en cultivo de motoneuronas embrionarias puras

Las motoneuronas puras en presencia del factor de crecimiento nervioso derivado de glías (GDNF), se desarrollan y sobreviven en condiciones de laboratorio (control positivo). En ausencia de este factor un 35 % de estas células no fueron viables (control negativo). El EGF no tuvo efecto neuroprotector. En cambio, el GHRP₆ en una concentración de 100 µg/ml, produjo un efecto trófico similar al GDNF en términos de supervivencia y crecimiento celular (Fig.3).

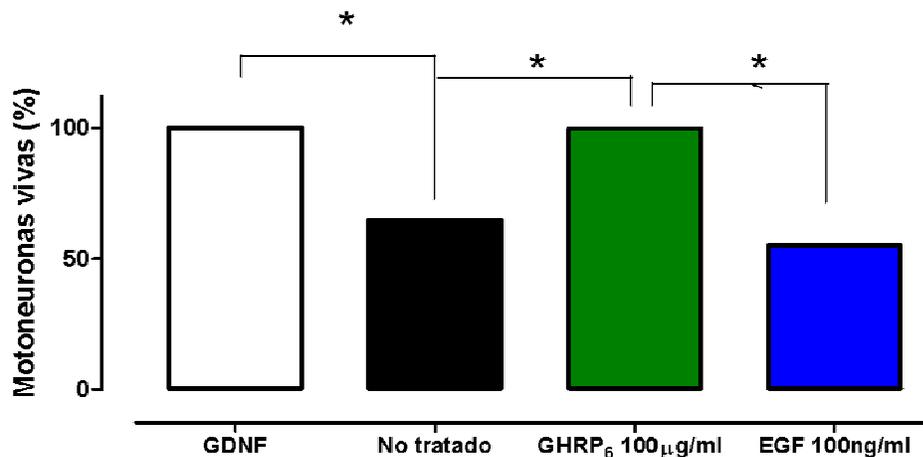


Figura 3. Efectos del EGF y del GHRP₆ en cultivo de motoneuronas puras. Porcentaje de motoneuronas embrionarias puras que sobrevivieron en cultivo con EGF (100 ng/ml) o GHRP₆ (100 µg/ml) en ausencia de GDNF con respecto al control positivo (GDNF 1ng/ml). Prueba X² de comparación de porcentajes y prueba de Fisher. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

4. 2. 2 Efectos del EGF, GHRP6 y la combinación EGF+GHRP₆ en un cultivo mixto de motoneuronas embrionarias expuestas a un agente inductor de apoptosis

Las motoneuronas embrionarias cultivadas junto a otras células de la glía y en presencia de factores tróficos presentan un fenotipo característico dado por un soma de gran tamaño, abundantes dendritas y axones gruesos y largos (Fig. 4 A y B). Al inducir estrés

celular tratando las células con el agente pro-apoptótico estaurosporina (STU), el análisis cualitativo de la morfología de las motoneuronas embrionarias reveló reducción del cuerpo neuronal, pérdida de las neuritas, acortamiento significativo de los axones (Fig. 4 D y E) y signos de estrangulación axonal (Fig. 4 C).

Los cultivos primarios de motoneuronas embrionarias tratados simultáneamente con STU y con EGF, GHRP₆, EGF+GHRP₆ o el Arimoclomol conservaron su morfología característica, similar al control en ausencia de STU (Fig. 4 A y B), aunque se encontraron algunas motoneuronas afectadas.

También se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante el cálculo de la fracción de área que ocupan las motoneuronas MAP-2⁺ con respecto al área total de cada una de las imágenes procesadas. La fracción de área ocupada por motoneuronas MAP-2 positivas en el cultivo mixto de motoneuronas tratado con STU resultó inferior en comparación con la fracción de área del cultivo de motoneuronas que no contiene este agente pro-apoptótico. La fracción de área ocupada por motoneuronas MAP-2 positivas fue superior en los cultivos tratados con STU+EGF, STU+GHRP₆, STU+EGF+GHRP₆ y STU+Arimoclomol respectivamente. En estos casos la fracción de área fue similar a la de las células que no se trataron con STU (Fig. 4 F, G, H).

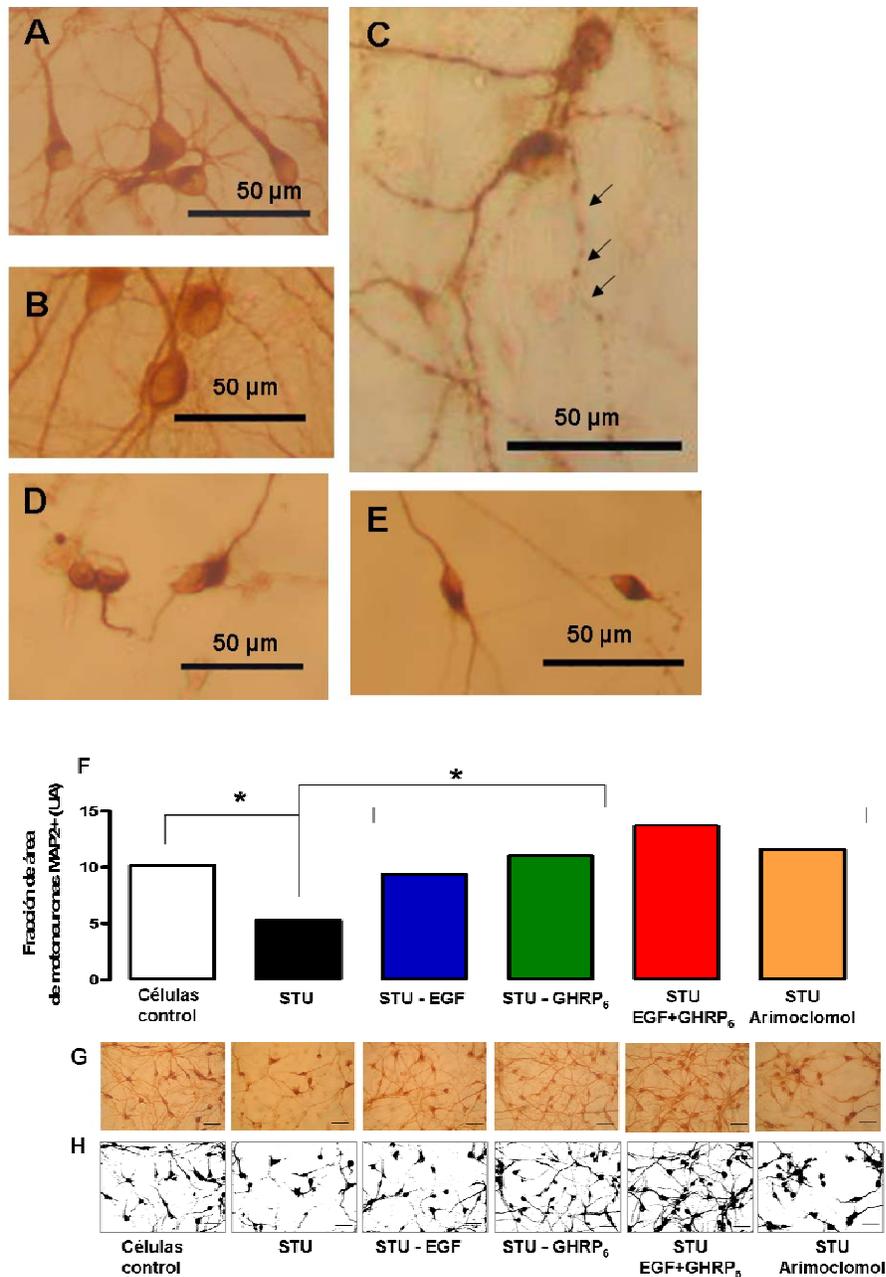


Figura 4. Efectos del EGF, GHRP₆ y EGF+GHRP₆ en cultivos primarios de motoneuronas embrionarias y glías tratados con estaurosporina. **A** y **B**: Microfotografías de motoneuronas MAP-2 positivas como control de motoneuronas en ausencia de STU. **C**, **D** y **E**: Motoneuronas cultivadas durante 8 horas en presencia de STU. Las flechas señalan puntos de estrangulación axonal. **F**: Fracción de área que ocupan las motoneuronas MAP-2 positivas con respecto al area total de la imagen. **G**: Microfotografías de motoneuronas MAP-2 positivas representativas de cada uno de los grupos experimentales. **H**: Segmentación digital de cada imagen correspondiente en el panel G, utilizada para el cálculo de la fracción de área. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos indican diferencias significativas. La barra negra en el extremo inferior derecho de cada imagen equivale a 50 μ m.

4. 2. 3 Efecto del EGF+GHRP₆ sobre la expresión cuantitativa de los genes IGF-1 y TNF α en la médula espinal de los animales transgénicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A)

El tratamiento de los animales transgénicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A) con la combinación EGF+GHRP₆ produjo un incremento de la expresión del gen IGF-1 con respecto al control transgénico tratado con vehículo y con respecto al control sano no transgénico. (Fig.5A). En relación con la citocina TNF α , tanto los animales transgénicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A) del grupo control vehículo como los tratados con EGF+GHRP₆ exhibieron niveles superiores de este transcrito en la médula espinal respecto a los controles sanos no transgénicos; sin embargo, los niveles de TNF α fueron menores en el grupo tratado con la combinación respecto al grupo control de vehículo (Fig.5B) (Tabla 2).

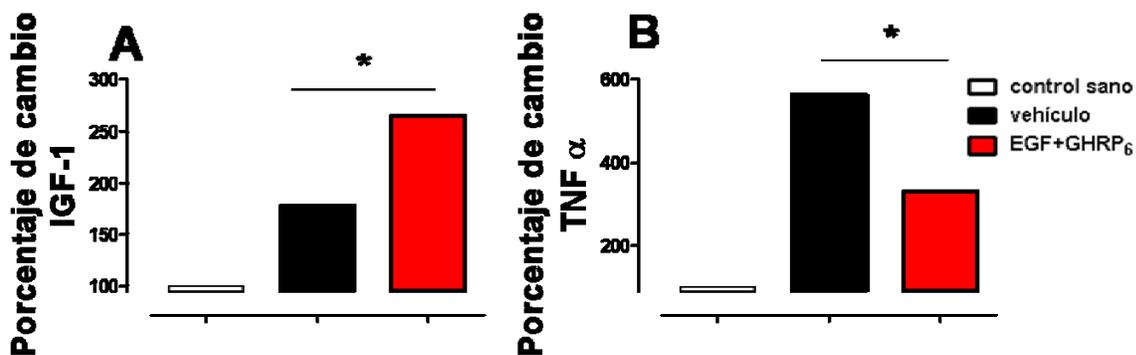


Figura 5. Valores de los transcritos de los genes IGF-1 (A) y TNF α (B) en la médula espinal de los ratones transgénicos (SOD1-G93A) tratados con EGF+GHRP₆ y no tratados (control de vehículo) expresados en porcentaje con respecto a los ratones no transgénicos (control sano). Prueba X² de comparación de porcentajes. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

Tabla 2. Valores de los transcritos de los genes IGF-1 y TNF α en la médula espinal de los ratones transgénicos (SOD1-G93A) tratados con EGF+GHRP₆ y no tratados (control de vehículo) expresados en porcentaje con respecto a los ratones no transgénicos (control sano).

Transcrito	Control sano %	Transgénico (vehículo) %	Transgénico EGF+GHRP ₆ %	Porcentaje de cambio en Tg EGF+GHRP ₆ vs. Tg vehículo
IGF-1	100	178	264	+ 48 %
TNF α	100	663	331	- 70 %

Con los datos primarios correspondientes a los porcentajes de cambio en la expresión de los transcritos se estableció el índice IGF-1/ TNF α . Los dos grupos experimentales de animales transgénicos tenían menor predominio de IGF-1 que el grupo control no transgénico. Sin embargo, en comparación con el grupo control de vehículo los animales que se trataron con EGF+GHRP₆ mostraron niveles predominantes del IGF-1 respecto al TNF α (Fig. 6).

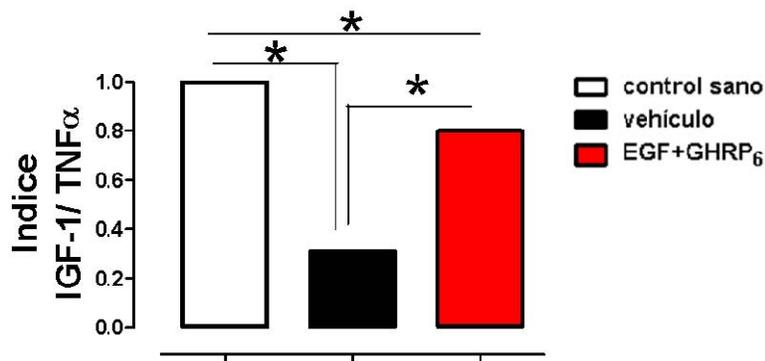


Figura 6. Índice de la expresión del transcrito de IGF-1 respecto al de TNF α . Prueba X^2 de comparación de porcentajes. El asterisco indica diferencia significativa.

4. 2. 4 Efectos de EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆ en un modelo de patología axonal inducida con 1,2 DAB

4. 2. 4. 1 Validación del modelo de patología axonal

4. 2. 4. 1. 1 Evaluación clínica

La administración repetida del 1,2 DAB produjo afectación motora, pérdida de peso, y disminución de la fuerza muscular en todos los animales. Ningún animal alcanzó la barra horizontal con las patas traseras (Fig. 7 A-C).

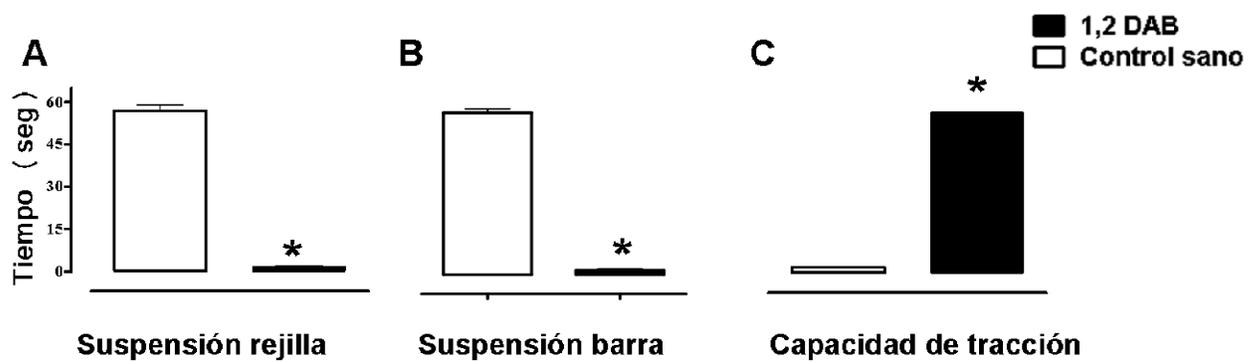


Figura 7. Evaluación de la fuerza muscular en animales enfermos por 1,2 DAB (n=60) y en controles sanos (n=10). **A**: Tiempo de suspensión en rejilla. **B y C**: Reflejo prensil en barra horizontal **B**: Tiempo de suspensión y **C**: Capacidad de tracción. Los datos representan la media y el error estándar de la media. Prueba t de Student. Los asteriscos indican diferencias significativas.

La prueba en campo abierto se usa comúnmente para el estudio de la actividad espontánea exploratoria (265); aquí se usó como una prueba adicional, útil para demostrar el compromiso motor presente en los animales enfermos. Tanto el número de cuadrados cruzados como el número de empinamientos fueron menores en los animales tratados con 1,2 DAB con respecto al grupo control sano (Fig. 8 A, B). Los animales normalmente extienden sus patas traseras cuando son suspendidos por la cola, lo que se conoce como “reflejo de extensión”. Los animales enfermos por 1,2 DAB perdieron dicho reflejo, lo cual se manifestó por una flexión extrema de las patas traseras hacia la región abdominal (Fig. 8 C-E)

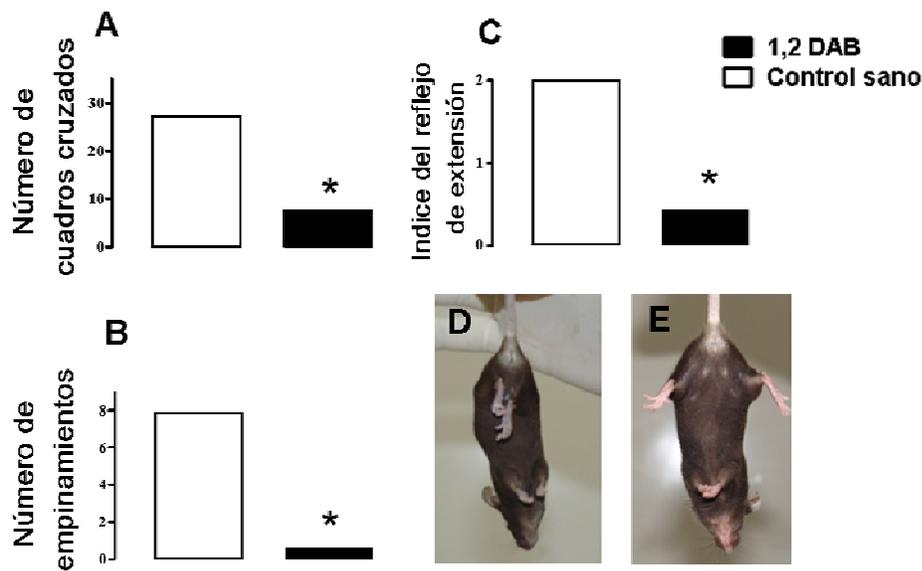


Figura 8. Evaluación conductual en animales enfermos por 1,2 DAB (n=60) y en controles sanos (n=10). **A:** Número de cuadros cruzados en la prueba de campo abierto. **B:** Número de empinamientos en la prueba de campo abierto. **C:** Escala del reflejo de extensión. **D y E:** Prueba de suspensión por la cola. Postura típica de un animal tratado con 1,2 DAB (D). Postura típica de un animal control sano (E). Los datos representan las medianas. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney.

Los resultados anteriormente referidos se acompañaron de un patrón de marcha anormal que consistió en un incremento en el ancho de la marcha y una reducción de la longitud del paso y de la distancia entre los pasos alternos (patas derecha e izquierda) (Fig.9 A-C).

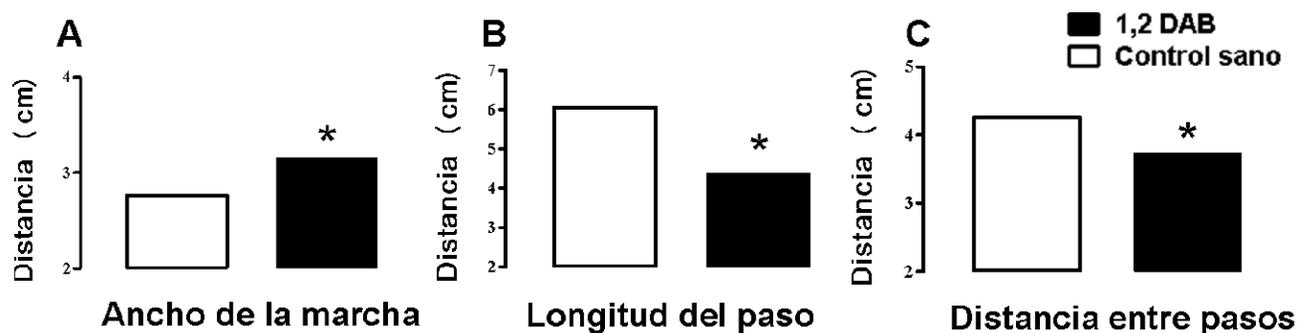


Figura 9. Análisis de la marcha después de la inducción de axonopatía por 1,2 DAB. Valores promedio de **A:** ancho de la marcha, **B:** longitud del paso, y **C:** longitud entre los pasos, de los ratones controles (n=10) y los enfermos por 1,2 DAB (n=60) al final del período de intoxicación con 1,2 DAB. El asterisco indica diferencia significativa según la prueba U de Mann-Whitney.

4.2.4.1.2 Evaluación electrofisiológica

Para evaluar si los signos clínicos se acompañaron de cambios electrofisiológicos se registró el potencial de acción muscular complejo (PAMC): la amplitud se redujo en tanto que la latencia y la duración aumentaron. La afectación fue más evidente en el segmento S1 [S1 - S2] (Fig. 10).

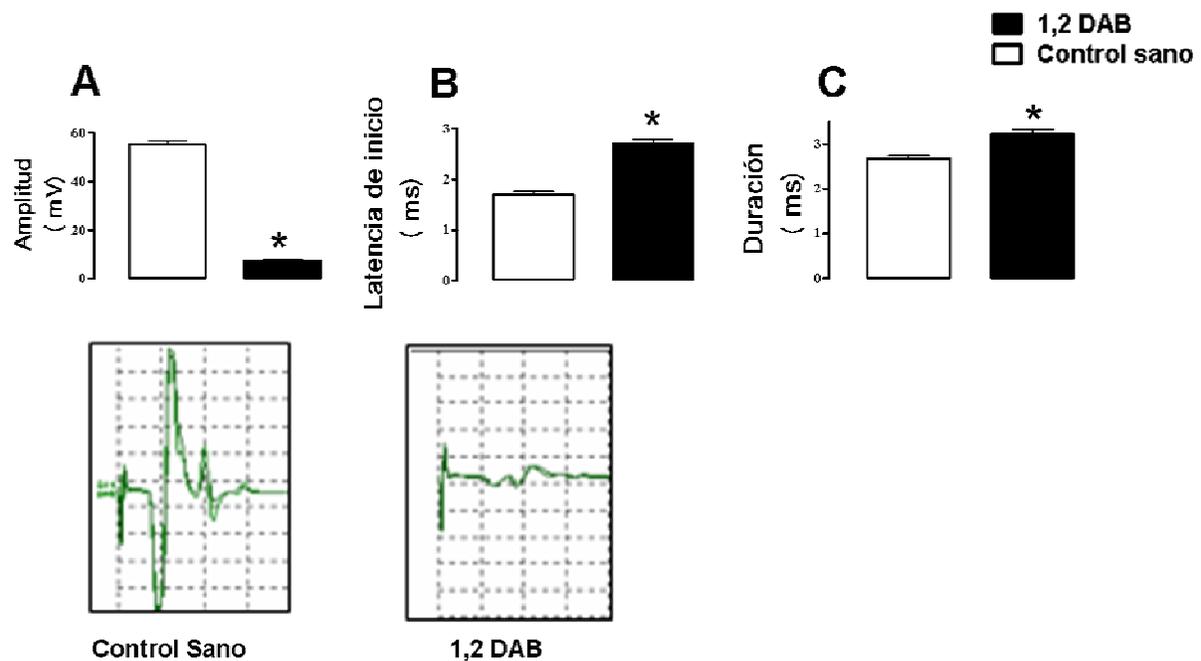


Figura 10 Efecto de la administración de 1,2 DAB sobre el potencial de acción muscular compuesto. Registro monopolar del PAMC en el segmento S1. **A**: amplitud, **B**: latencia y **C**: duración. Las barras representan los valores promedio de los controles sanos (n=10) y los enfermos (n=60) al final del período de intoxicación con 1,2 DAB. Los trazados representan los registros del PAMC proximal (S1) de animales sanos y enfermos Prueba t de Student. Los asteriscos indican diferencia significativa.

4. 2. 4. 1. 3 Ultraestructura de la médula espinal y del nervio ciático

El análisis ultraestructural de axones del asta anterior de la médula espinal y del segmento proximal del nervio ciático en los animales afectados por el 1,2 DAB reveló alteración en las vainas de mielina, que presentan separación entre sus capas. Ocasionalmente se observó balonamiento mitocondrial en las neuronas de la médula (Fig. 11).

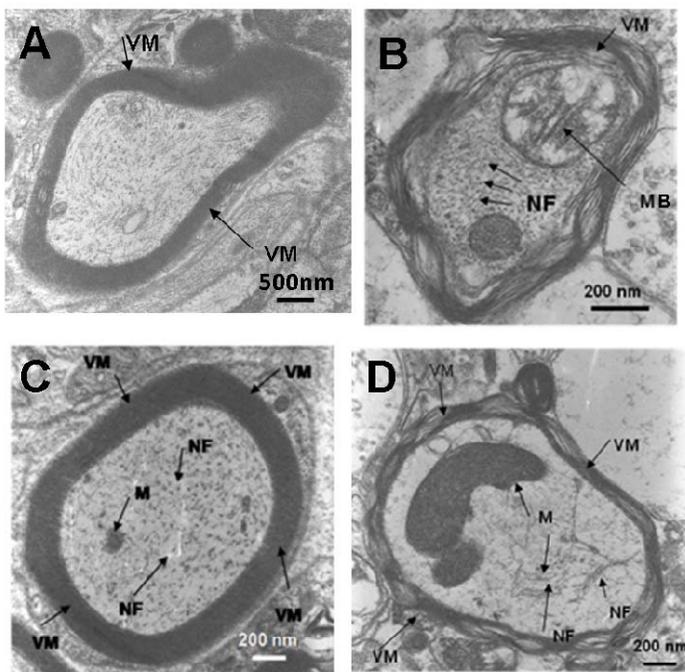


Figura 11. Ultraestructura de axones de la médula espinal y del nervio ciático. A: Axón de la médula espinal del control sano y B: Axón de la médula espinal del ratón intoxicado con 1,2 DAB. C: Axón del nervio ciático del control sano y D: Axón del nervio ciático de ratón intoxicado con 1,2 DAB.

VM: Vainas de mielina, M: mitocondrias, NF: neurofilamentos y MB: mitocondria balonada.

4. 2. 4. 2 Efecto de los tratamientos con EGF, GHRP₆ y EGF+GHRP₆ en el modelo de patología axonal inducida con 1,2 DAB

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 control de vehículo a los 20 días después del tratamiento. Un análisis de regresión confirmó este resultado. Este efecto terapéutico (aumento del IPAMCI) fue apreciable, además, por simple inspección de la morfología del PAMC, pues las diferencias en latencia de inicio y amplitud fueron notables (Fig. 12).

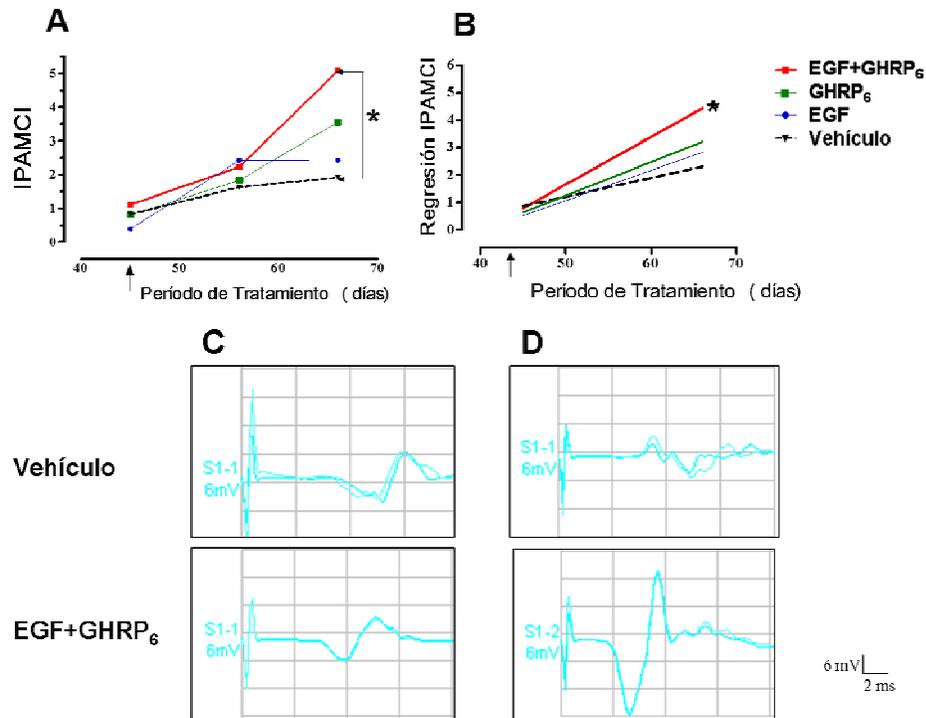


Figura 12. **A:** Efectos del EGF, GHRP₆, y la combinación EGF+GHRP₆ en la recuperación del IPAMCI. La flecha indica el último día de administración del 1,2 DAB. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. **B:** Análisis por regresión lineal de la evolución del IPAMCI, durante los tratamientos con EGF, GHRP₆, EGF+GHRP₆ y con solución salina (0.9% NaCl como control de vehículo). Los asteriscos indican diferencia respecto al grupo control de vehículo. Registros representativos del PAMC antes (**C**) y después (**D**) de 21 días de tratamiento con vehículo y con 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. 13).

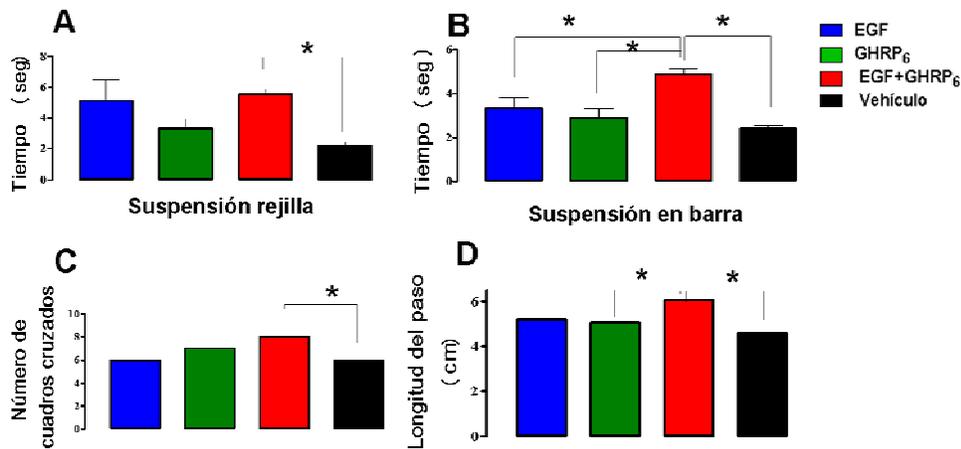


Figura 13. Evaluación clínico-conductual después de 10 días de tratamientos con EGF, GHRP₆, EGF+GHRP₆ y con solución salina (0.9% NaCl como control de vehículo). **A:** Prueba de suspensión en rejilla, **B:** Reflejo prensil en la prueba de suspensión en barra. **C:** Actividad exploratoria en campo 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). Los asteriscos indican diferencias estadísticas.

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. 14). No se observaron signos de efectos adversos durante el tratamiento de los péptidos separados ni en combinación.

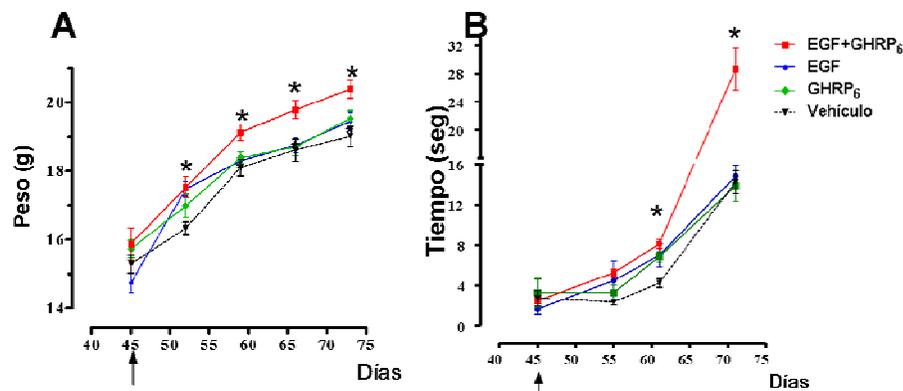


Figura 14. Efecto de los tratamientos con EGF, GHRP₆, la combinación EGF+GHRP₆, y con solución salina (0.9% NaCl como control de vehículo) sobre el peso corporal (**A**), y sobre la fuerza muscular (**B**). La flecha señala el inicio de los tratamientos. Prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnet. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al grupo control de vehículo.

4. 3 Discusión

4. 3. 1 Efectos del EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆ en cultivos de motoneuronas embrionarias

En la fisiopatología de los fenómenos neurodegenerativos tienen un papel destacado los factores tóxicos y la activación de eventos moleculares que producen apoptosis y la ausencia de factores de crecimiento nervioso (266;267). En la búsqueda de agentes terapéuticos con propiedades neuroprotectoras, el cultivo primario de motoneuronas embrionarias constituye un modelo experimental importante debido a la vulnerabilidad de estas células ante agentes tóxicos y a su dependencia de factores de crecimiento nervioso para su desarrollo y viabilidad (268). Cuando un compuesto produce un efecto neuroprotector en cultivos de motoneuronas sometidas a condiciones de estrés, éste compuesto tiene probabilidades de producir el mismo efecto neuroprotector en la situación clínica análoga (enfermedades neurodegenerativas de las motoneuronas).

Atendiendo a esas consideraciones se diseñaron dos experimentos para la evaluación del efecto neuroprotector de los principios activos EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆. El primero de estos experimentos se realizó en un cultivo primario de motoneuronas aisladas con alto grado de pureza. Este ensayo se fundamenta en la ocurrencia del fenómeno de apoptosis en las motoneuronas en ausencia de los factores de crecimiento nervioso (220). En estas condiciones las células solo sobreviven si al medio de cultivo se le adiciona GDNF (269). Los candidatos neuroprotectores se evalúan atendiendo a su capacidad para reproducir los efectos tróficos que produce el GDNF.

En el otro experimento (4. 3. 1. 2) se utilizó un cultivo de motoneuronas y glías, y como reto se adicionó un agente inductor de apoptosis, la estaurosporina (STU).

4. 3. 1. 1 Efectos del EGF y del GHRP₆ en cultivo primario de motoneuronas puras en ausencia de factores tróficos

La ausencia de GDNF en el medio de cultivo produce una mortalidad del 40-50 % de las motoneuronas (270). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos son similares a los descritos previamente porque un 35% de las células carente de soporte trófico no

sobrevivió. El único de los candidatos que se evaluaron que demostró efecto neuroprotector fue el GHRP₆, con resultados similares al GDNF. Este resultado confirma lo descrito antes sobre el papel neuroprotector de la grelina, análogo natural del GHRP₆, en un modelo de degeneración excitotóxica de motoneuronas (57). El hecho de que el EGF no influyera significativamente en la supervivencia de las motoneuronas embrionarias puede deberse a que éste interviene específicamente en la neuritogénesis y en el alargamiento de los axones durante la embriogénesis de la médula espinal (271). Así se explica que el efecto citoprotector del EGF, demostrado en neuronas corticales (43;45), no se reproduce en motoneuronas embrionarias (272), aún teniendo éstas el receptor específico para EGF (EGFR) (273;274).

Durante el desarrollo fetal, las motoneuronas producen como factor trófico relevante el factor de crecimiento transformante tipo alfa (TGF α), el cual activa eventos moleculares que permiten el desarrollo y la supervivencia de estas células (273). Muchos autores consideran el TGF α como el análogo embrionario del EGF (275;276) porque en el desarrollo embrionario sus niveles de expresión sobrepasan los niveles de cualquier otro factor trófico (276). Se piensa que el TGF α pudiera competir con el EGF exógeno como ligando del mismo receptor porque los niveles del TGF α en el sistema nervioso embrionario son superiores a los de cualquier otro agente neurotrófico, incluyendo al EGF (276). Por otra parte, las formas no procesadas del TGF α producido por las motoneuronas y ancladas a membrana estimulan al EGFR (277), lo cual confiere al TGF α una ventaja estérica respecto al EGF soluble exógeno. Esta situación no permite evaluar las potencialidades biológicas específicas del EGF (278) en ausencia de factores tróficos. Los elementos anteriormente referidos pudieran explicar por qué en el cultivo puro de motoneuronas embrionarias el EGF no logra reemplazar al GDNF en su función de factor de supervivencia (269), como sí lo hace el GHRP₆ (Fig.15).

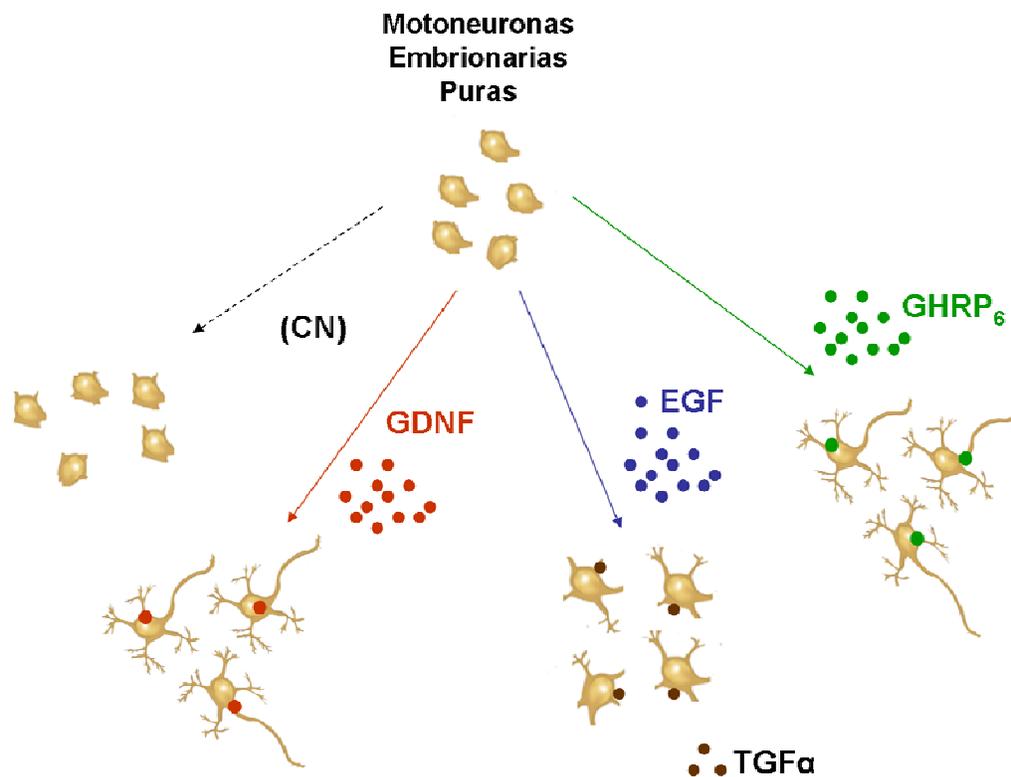


Figura 15. Representación gráfica del cultivo de motoneuronas embrionarias puras y su evolución dependiente de la presencia o no de factores de crecimiento en el medio de cultivo. Control negativo (CN), con GDNF (rojo), con EGF (azul) y con GHRP₆ (verde); TGFA (marrón).

Atendiendo a los resultados anteriores consideramos no evaluar el efecto de la combinación EGF+GHRP₆ en este sistema experimental, pues el efecto del GHRP₆ fue absoluto en términos de protección y tan similar al del GDNF, y por el contrario el EGF tan similar al control negativo, que cualquier efecto de la combinación EGF+GHRP₆ en los cultivos de motoneuronas sería atribuible al GHRP₆.

4. 3. 1 .2 Efectos del EGF, del GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆ en cultivo de motoneuronas y glías expuestas a un agente inductor de apoptosis

En este experimento, realizado en un cultivo primario de motoneuronas y glías, se usó como reto la estaurosporina (STU). La STU es un inhibidor no selectivo de proteínas quinasas que induce apoptosis en neuronas y glías. El cultivo de motoneuronas tratado con STU por 8 horas mostró signos de daño similares a los que describen otros autores que han tratado hasta por 24 horas (279). Los signos de daño neuronal inducido por la STU en este experimento fueron la reducción del cuerpo neuronal y el acortamiento de

axones y dendritas, lo cual coincide con lo descrito previamente (280). Adicionalmente, los signos de tinción discontinua en los axones sugieren deterioro del transporte axonal.

El parámetro que se usó para evaluar cuantitativamente el efecto de la STU fue la fracción de área ocupada por motoneuronas con respecto al área total de la imagen, la cual permitió valorar la viabilidad del cultivo en su conjunto. Los cultivos que solo recibieron STU (sin ningún posible neuroprotector) exhibieron menor fracción de área ocupada por neuronas que el resto de los cultivos que sí recibieron los tratamientos (Fig. 4F). Considerando el papel trófico de las glías con respecto a las motoneuronas (97), este experimento sugiere que las células de la glía, igualmente vulnerables al efecto pro-apoptótico de la estaurosporina (280), también fueron protegidas por los principios activos evaluados.

Los mecanismos moleculares para explicar los efectos del EGF y GHRP₆ no fueron objeto de estudio en este experimento, sin embargo, investigaciones de otros autores contribuyen a explicar los resultados obtenidos (23-29): Los receptores de los secretagogos de hormona de crecimiento (GHSR) que median los efectos de estas moléculas en las células diana se han identificado en neuronas y glías de cerebro y médula espinal (281). Se conoce que el efecto del GHRP₆ en la supervivencia de las motoneuronas, constatado en los ensayos *in vitro* de esta tesis, está asociado a su capacidad neuroprotectora más relevante, la cual consiste en una acción antiapoptótica directa sobre las motoneuronas relacionada tanto con la inducción del factor anti-apoptosis Bcl-2, como con la interferencia de la translocación del factor inductor de apoptosis (APAF) hacia el núcleo (25;27). Otro mecanismo que contribuye a la protección neuronal mediada por el GHRP₆, es la inducción del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (30;66;282). El IGF-1, cuyo efecto neuroprotector es conocido, activa la transducción de señales asociadas a eventos anti-apoptóticos (68;283), lo cual también beneficia a las glías (284-287).

El efecto citoprotector del EGF en el cultivo mixto de motoneuronas favorece fundamentalmente a las células gliales, que todas expresan el EGFR (288-290) y

pueden contribuir a la supervivencia de las motoneuronas mediante la acción paracrina de sus propios factores de crecimiento (291-294). La acción combinada del EGF y el GHRP₆ en el cultivo de motoneuronas y de células de la glía expuestas a la acción de la STU posibilita que los efectos citoprotectores de ambas moléculas, dirigidos a motoneuronas y a glías, al preservar su integridad, reproduzcan las interacciones celulares que de manera natural ocurren en la médula espinal, donde la acción paracrina y autocrina de factores neurotróficos es indispensable para la fisiología celular (Fig. 16).

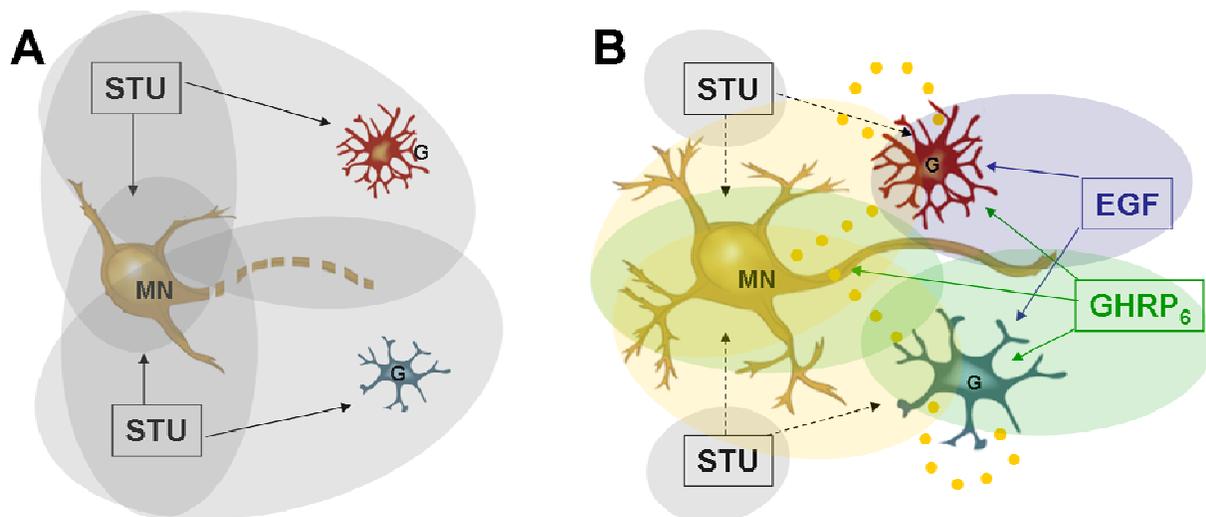


Figura 16. Representación gráfica del cultivo de motoneuronas (MN) y glías (G) expuestas a estaurosporina (STU). **A:** Sin factores tróficos. **B:** Con EGF y GHRP₆ como factores tróficos. Puntos amarillos: factores tróficos derivados de las glías

4. 3. 2 Efecto del EGF+GHRP₆ en la expresión cuantitativa de los genes IGF-1 y TNF α en la médula espinal de los animales transgénicos para SOD1

Los animales transgénicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A) desarrollan los primeros signos del déficit neuromuscular alrededor de la semana 34 (257). El tratamiento con EGF+GHRP₆ ocurrió a partir de la cuarta semana. Este período pre-sintomático no excluye la ocurrencia de transformaciones moleculares inducidas por la sobre-expresión de la SOD humana con la mutación G93A (295;296). Prueba de ello es el incremento en la expresión del TNF α en los animales transgénicos respecto al control sano registrado en este experimento (Fig. 5B y C). A pesar de la falta de signos clínicos en esta etapa temprana, se pudo evaluar el efecto terapéutico de la combinación EGF+GHRP₆.

En este experimento se demostró que la administración de la combinación farmacológica EGF+GHRP₆ fue capaz de modificar el ambiente pro-inflamatorio característico de esta enfermedad (297) y al mismo tiempo incrementó los mecanismos endógenos de neuroprotección, específicamente la expresión del gen que codifica el IGF-1 (298;299).

La reacción inflamatoria y la infiltración de células inmunocompetentes en la vecindad de las motoneuronas afectadas se presenta en la Esclerosis Lateral Amiotrófica y en su modelo animal, el transgénico SOD1 (96;300). La reacción inflamatoria contribuye a potenciar los eventos neurodegenerativos a través de la producción de las citocinas, principalmente el TNF α (295;301). El hecho de que el nivel de TNF α en el grupo que recibió la combinación EGF+GHRP₆ fuera menor que el grupo de animales transgénicos control de vehículo sugiere que la combinación controla el ambiente inflamatorio mediado por TNF α , lo cual repercute en una atenuación del proceso neurodegenerativo.

La relación entre el IGF-1 como factor neuroprotector y el TNF α como citocina inflamatoria, se usa con frecuencia para describir tanto la complejidad de un evento patológico como los efectos de una acción terapéutica (302;303). El predominio del transcrito IGF-1 en el grupo EGF+GHRP₆ respecto al grupo control de vehículo (Fig.6A) fue otro resultado importante. El aumento del IGF-1 en el grupo tratado, por encima de los niveles de la respuesta fisiopatológica compensatoria (298;304) ante la degeneración neuronal (305), se ha relacionado con la reducción en los niveles de TNF α y óxido nítrico (302), lo cual concuerda con el mayor porcentaje de cambio de la citocina TNF α y con el menor predominio que se observó en el grupo control de vehículo (Fig 5B y Fig.6). El hecho de que en la médula espinal de los animales transgénicos tratados predomine el IGF-1 sobre el TNF α , implica que el IGF-1 puede estar involucrado no solo en la atenuación de los niveles del TNF α (302) sino también en la reducción de la capacidad de esta citocina para inducir apoptosis en las motoneuronas (302;306). Además, el IGF-1 media otras acciones citoprotectoras dirigidas hacia las motoneuronas y glías (68;283).

El efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en animales transgénicos se pudiera explicar por las acciones neuroprotectoras de cada componente. El GHRP₆ ,

conocido por su capacidad de inducir la expresión de dos neuroprotectores endógenos, el IGF-1 (66) y la hormona de crecimiento (307), tiene efectos citoprotectores directos al revertir la excitotoxicidad mediada por el glutamato (25;27), la cual es un elemento clave en la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica y de su modelo transgénico (308). El EGF, por su parte, protege contra la apoptosis inducida por TNF α (309). También se ha demostrado su efecto anti-excitotóxico en contextos donde existe un incremento de glutamato (226;310-312) como el que ocurre en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (313) y en su modelo experimental transgénico de SOD1 (314).

4. 3. 3 Efecto de la administración de EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+ GHRP₆ en el modelo de patología axonal inducida por el 1,2 DAB

4. 3. 3. 1 Análisis del modelo patología axonal inducido por el 1,2-DAB

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa de etiología compleja y multifactorial, que ha sido difícil de reproducir experimentalmente. Recientemente se ha descrito que el 1,2-DAB reproduce varios mecanismos de la patología axonal de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (260;315). El 1,2 DAB, como gamma dicetona, reacciona con los grupos aminos primarios de las proteínas para formar polímeros de alto peso molecular, fundamentalmente con el grupo ϵ -amino de la L-lisina. Los neurofilamentos y otras proteínas relacionadas con el transporte axonal tienen un alto contenido de L-lisina y reaccionan con el 1,2-DAB formando agregados (316). La estrangulación axonal proximal provocada por acumulación de neurofilamentos y microtúbulos (317) característica de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (318;319), se produce también en este modelo.

En este trabajo se confirmó mediante el registro del PAMC el compromiso del segmento proximal de los axones motores que inervan a las extremidades posteriores. El incremento en la latencia de inicio del PAMC indica que la velocidad de conducción del impulso nervioso en el segmento proximal está comprometida, lo cual puede explicarse a partir del daño a las estructuras mielínicas y al citoesqueleto axonal. El aumento en la duración del PAMC y la disminución concomitante de su amplitud se explica por la falta

de sincronización y dispersión temporal en la conducción de los impulsos nerviosos, reflejando diferentes grados de afectación de las fibras motoras, y probablemente la pérdida total de la conducción en algunas de estas. Estos resultados coinciden con la afectación en la organización mielina-axón, demostrada con anterioridad en la caracterización ultraestructural y sustentan la disminución significativa de la fuerza muscular y de la coordinación motora durante la marcha observada en este trabajo en los animales tratados con 1,2-DAB.

La pérdida de continuidad en las capas de la vaina de mielina observada en los animales enfermos se ha constatado en otros modelos experimentales de Esclerosis Lateral Amiotrófica (320) y en los estadios más avanzados de la propia enfermedad (321;322) Constituyendo otro de los elementos que sustentan la capacidad del 1,2 DAB para reproducir la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.

El patrón neuroproteómico de la patología axonal inducida con 1,2 DAB ha demostrado que esta gamma dicetona reduce la expresión de proteínas involucradas en el mantenimiento del citoesqueleto, y las que controlan los mecanismos redox y de plegamiento de proteínas (323). El 1,2 DAB reduce la expresión de las proteínas gelsolina y disulfuro isomerasa (PDI) (324) lo cual contribuye a una pérdida de la citoarquitectura normal de neurofilamentos y microtúbulos. Las modificaciones en la expresión de gelsolina se han descrito en modelos transgénicos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (325) y además en los enfermos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (326;327).

La expresión reducida de la gelsolina contribuye al proceso de apoptosis que experimentan las motoneuronas en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (326;328) . Por su parte, los cambios en la expresión de PDI y su capacidad de S-nitrosilación se han invocado como contribuyentes a la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (329;330). La PDI es la encargada de la S-nitrosilación de proteínas en el retículo endoplasmático durante la respuesta al estrés celular, lo cual también forma parte de la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (330;331). En apoyo de lo anterior, se ha demostrado que la expresión normal de la PDI garantiza un fenotipo menos agresivo

en ratones SOD1-G93A (332). La contribución al estrés oxidativo en células neuronales es también atribuible al 1,2-DAB (333). La generación de especies reactivas del oxígeno tiene un papel significativo en la fisiopatología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (334). Estas acciones pro-oxidantes del 1,2-DAB contribuyen a establecer un cuadro neurotóxico semejante al de la enfermedad humana.

La presencia de mitocondrias balonadas y alteradas en su morfología en los ratones tratados con 1,2 DAB remedan la morfología de las mitocondrias descritas en motoneuronas de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (335;336), y en ratones transgénicos de SOD1 mutada (337). El daño mitocondrial está relacionado con la alteración del proceso de respiración celular (338), con la generación de especies reactivas del oxígeno (339) y con la inducción de apoptosis (340).

En conjunto, la reacción directa con proteínas del citoesqueleto neuronal que provocan la estrangulación axonal, la afectación de la unión mielina-axón, el daño a las mitocondrias y la inducción de especies reactivas del oxígeno, así como la desregulación de proteínas esenciales para la supervivencia neuronal, son elementos que permiten explicar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la patología axonal inducida por el 1,2-DAB y afirmar que este modelo experimental reproduce varios elementos patogénicos de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (260;315;341).

La fisiopatología del modelo con 1,2-DAB es comparable a la de otros modelos experimentales de Esclerosis Lateral Amiotrófica, e incluso pudiera ofrecer el sustrato clínico y/o bioquímico que falta en los mismos y que es la causa de lo poco predictivo que resultan (342;343).

Adicionalmente, el hecho de que este modelo experimental sea inducido por un agente tóxico, y de que se caracterice por manifestación clínicas compatibles también con una neuropatía periférica, sugiere que el modelo de axonopatía inducida por 1,2 DAB puede ser considerado como un modelo experimental de neuropatía periférica y ser útil para la evaluación de intervenciones terapéuticas dirigidas a las axonopatías de etiología tóxica.

Dentro de los trastornos del sistema nervioso periférico las neuropatías tóxicas constituyen las formas de disfunción con mejores posibilidades de revertir el daño después de un tratamiento farmacológico (344). Por tal razón el modelo de axonopatía inducida por 1,2 DAB, que comparte algunos de los elementos fisiopatológicos de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, también puede ser útil en la realización de pruebas de concepto sobre el potencial neuroterapéutico de fármacos en estudio para este grupo de disfunciones del sistema nervioso periférico.

4. 3. 3. 2 Efectos del EGF, GHRP₆ y del EGF+GHRP₆ en el modelo de patología axonal inducida por el 1,2-DAB

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). El índice integral del PAMC (IPAMCI), relaciona latencia, duración y amplitud del potencial de acción y amplía hasta cuatro veces tales diferencias. El IPAMCI devino una variable reproducible y confiable.

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 (345;346). 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 favorable para proteger células del tejido nervioso.

La mayoría de los mecanismos que afectan las motoneuronas en Esclerosis Lateral Amiotrófica (daño oxidativo, disfunción mitocondrial, deficiencia de factores de crecimiento, patología de las glías y excitotoxicidad mediada por glutamato) son blancos de las acciones citoprotectoras del EGF (3;23;24;41;46;311;347). Como la toxicidad inducida por glutamato es uno de los elementos patogénicos más relevantes en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, el efecto del EGF que favorece la recaptación del glutamato por los astrocitos, contribuye a reducir su toxicidad (26;311).

El GHRP₆ tiene una acción directa en la prevención y la reversión de la muerte inducida por glutamato, mediante la inactivación de la caspasa 9 y por evitar la fragmentación de la enzima ADP-ribosa polimerasa (27). Otros de los efectos neuroprotectores del GHRP₆ están mediados por la inducción de proteínas con funciones neuroprotectoras (61): la hormona de crecimiento (52) y el IGF-1 en algunas regiones del sistema nervioso central (27;66). 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) (348;349), 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. Las propiedades neuroprotectoras del IGF-1, que han sido demostradas *in vitro* o *in vivo*, sustentan la supervivencia de las motoneuronas espinales tanto durante la ontogenia como después de una lesión inducida (349). El IGF-1 protege a las neuronas de la muerte inducida por hipoxia, por hambre, y hasta por envejecimiento fisiológico (71;350). Los efectos terapéuticos del IGF-1 se han evidenciado tanto en el modelo animal (351;352) como en pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica (353).

Adicionalmente, se ha demostrado que la coexistencia del IGF-1 y el EGF es capaz de controlar la muerte celular e intervenir en la proliferación de las células precursoras neurales (354).

Las evidencias anteriores convergen para sustentar la noción de que los pacientes que presentan tanto las formas esporádicas como las familiares de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, pueden tratarse con la combinación EGF+GHRP₆. Ambos péptidos se

distinguen por su habilidad de hacer más tolerantes a numerosas líneas celulares frente a un amplio espectro de daños letales (12-16;355). La combinación de EGF+GHRP₆ puede constituir un ejemplo de terapia combinada beneficiosa en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, porque los mecanismos de acción de cada componente por separado contrarrestan eventos fisiopatológicos de esta enfermedad, tanto en puntos exclusivos como compartidos. La efectividad del uso combinado de EGF+GHRP₆ en la recuperación de la patología axonal inducida con 1,2 DAB ofrece una nueva perspectiva a considerar en la terapéutica de la Esclerosis Lateral Amiotrófica y de otras enfermedades de la motoneurona.

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 (356), existe una correlación negativa entre los niveles de IGF-1 en sangre y la severidad de de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (299) y se reduce la secreción de hormona de crecimiento (304;357). 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.

Por otra parte, la demostración del efecto terapéutico que produjo el tratamiento con EGF+GHRP₆ en la recuperación de los parámetros clínicos y electrofisiológicos del modelo de axonopatía tóxica inducida con 1,2 DAB, sugiere que el alcance de esta combinación farmacológica pudiera ser mayor y que, además de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, esta estrategia pueda aplicarse al tratamiento de neuropatías de origen tóxico.

4. 4 Resumen de Resultados

- a) El péptido GHRP₆ protege a las motoneuronas embrionarias en cultivo en ausencia de factores de crecimiento de manera similar al GDNF.
- b) El péptido GHRP₆, el EGF y la combinación de ambos protegen a las motoneuronas embrionarias del efecto pro-apoptótico de la estaurosporina.
- c) En la médula espinal de animales transgénicos B6SJL-TgN (SOD1-G93A), el tratamiento con EGF+GHRP₆ redujo la expresión del TNF α y aumentó la expresión del IGF-1.
- d) El modelo de patología axonal inducido con 1,2 DAB se validó desde el punto de vista clínico, electrofisiológico y ultraestructural.
- e) En el modelo de patología axonal inducido con 1,2 DAB, el tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ aceleró la recuperación de los parámetros clínicos y electrofisiológicos.

5. EFECTOS DEL EGF, GHRP₆ Y DE LA COMBINACIÓN EGF+GHRP₆ EN MODELOS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE COMO EJEMPLO DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE

5. 1 Materiales y Métodos

5. 1. 1 Animales de experimentación

Estos experimentos se realizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Habana, Cuba). Se emplearon ratones hembras de la cepa C57BL/6 (19 ± 1 g de peso corporal) de 10 semanas y ratas Lewis hembras de 5 semanas (CENPALAB, Cuba).

5. 1. 2 Inducción de EAE moderada

Para la inmunización de las ratas Lewis se preparó una emulsión encefalitogénica con un homogenizado de médula espinal de curiel 50% peso/volumen en solución salina con una cantidad equivalente del adyuvante completo de Freund (Sigma). La inmunización se realizó los días 0 y 6. Del inmunógeno (5mg / dosis) se inyectaron 200 μ l dividido en dos subdosis administradas como inyecciones subcutáneas en dos puntos del flanco derecho (día 0), cercanos a los linfonodos inguinales y axilares regionales. El mismo procedimiento se realizó el día 6, en el flanco izquierdo (Fig.17).

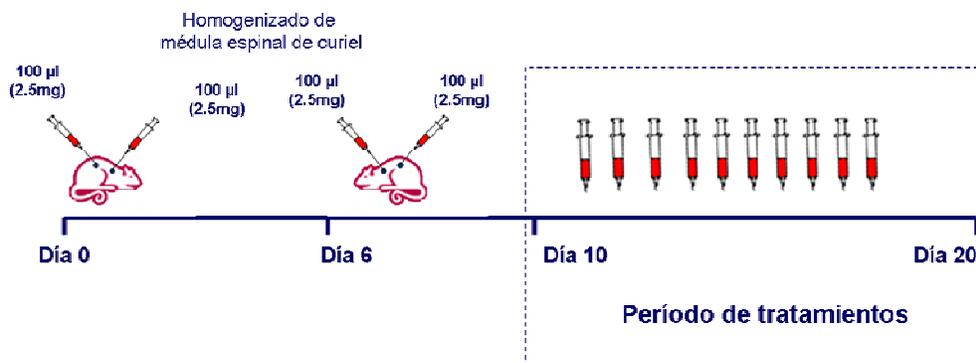


Figura 17. Esquema de inmunización y tratamientos en el modelo de EAE moderada

5. 1. 3 Inducción de EAE severa

La inmunización de los ratones C57BL/6 se realizó por vía subcutánea en los flancos derecho e izquierdo los días 0 y 7 respectivamente. El inmunógeno se preparó con el péptido encefalitogénico derivado de la mielina del oligodendrocito (MOG_{p35-55}: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) (Laboratorio de síntesis química, CIGB). Se preparó una emulsión con el MOG_{p35-55} (200 µg por cada 200 µl de adyuvante completo de Freund). A la emulsión se le adicionó el *Micobacterium tuberculosis* (Mt) inactivado con calor (H37 RA, Difco) para lograr una concentración final de 1mg/ml. Inmediatamente después de la primera inmunización y a las 48 horas a los ratones se les inyectó por vía endovenosa 200 µl de una solución de toxina de *Bordetella pertussis* diluida en PBS (1ng/µl) (List Biological) (Fig. 18)

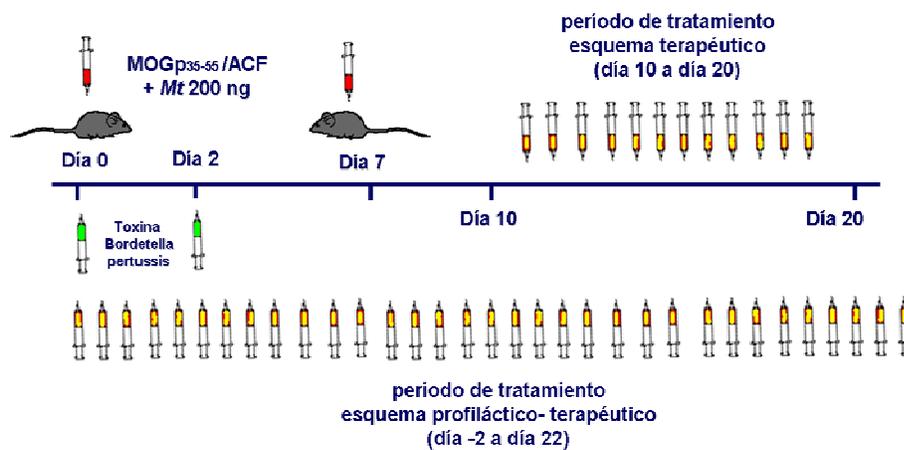


Figura 18. Esquema de inmunización y tratamientos en el modelo de EAE severa

5. 1. 4 Administración del EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆

El EGF y el GHRP₆ se diluyeron en solución salina estéril inmediatamente antes de su administración. Los tratamientos con EGF (200 µg/kg) (n=12) y GHRP₆ (660 µg/kg) (n=12) de manera independiente, solo se realizaron en el primer experimento de EAE moderada. Los otros grupos experimentales fueron un grupo que recibió la combinación EGF (200 µg/kg)+GHRP₆ (660 µg/kg) (n=12) y un grupo control de vehículo (n=12). Los tratamientos se inyectaron diariamente desde el día 10 hasta el día 20 contados a partir de la primera inmunización.

En el experimento de dosis-respuesta se confeccionaron cuatro grupos experimentales que se inyectaron con: EGF 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GHRP₆ 175 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (n=4), EGF100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GHRP₆ 330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (n=4), EGF 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + GHRP₆ 660 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (n=4) y con solución salina como grupo control de vehículo (n=8).

En el experimento de EAE severa un grupo recibió el tratamiento en esquema terapéutico EGF (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)+ GHRP₆ (660 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=14), desde el día 10 y hasta el día 20 posterior a la primera inmunización. El otro grupo se trató con la combinación EGF (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)+ GHRP₆ (660 $\mu\text{g}/\text{kg}$) siguiendo un esquema profiláctico-terapéutico (n=14), que comenzó dos días antes de la primera inmunización y terminó 22 días contados a partir del inicio de la inmunización (Fig.18) y a un tercer grupo se le inyectó solución salina como control de vehículo (n=14).

En todos los casos los tratamientos se inyectaron por vía intraperitoneal.

5. 1. 5 Evaluación clínica

Los animales se evaluaron diariamente de acuerdo a una escala de signos clínicos neurológicos previamente descrita (358) la cual incluye los siguientes parámetros: 0 = no signos de enfermedad; 1 = debilidad o parálisis de la cola; 2 = hemiparesia o parálisis de una de las patas traseras; 3 = parálisis de ambas patas traseras o parálisis de un hemicuerpo; 4 = parálisis completa, que involucra el diafragma; 5 = muerte. Con el propósito de obtener una evaluación clínica más completa, en la confección del índice clínico se tuvo en consideración la contribución de la pérdida o ganancia de peso (232). El porcentaje que representó la pérdida o ganancia de peso en el día del registro clínico más severo, se le adicionó o se sustrajo al puntaje registrado. Estas evaluaciones se realizaron por dos observadores entrenados y ajenos a los tratamientos.

5. 1. 6 Evaluación histológica

Los animales del experimento de EAE moderada se sacrificaron después de la evolución clínica (día 30). Los cerebros se extrajeron, se fijaron en formalina al 4%, se procesaron para incluir en parafina, se hicieron cortes de 8 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se contó el número de infiltrados inflamatorios. Todas las láminas se analizaron a ciegas.

5. 1. 7 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en la expresión del transcrito de IGF-1 en el cerebro de los animales con EAE moderada

El día 30 posterior a la primera inmunización los animales del experimento de EAE moderada que recibieron tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆, los del grupo control de vehículo y un grupo control sano, se sacrificaron y un fragmento del cerebro se extrajo para aislamiento de RNA total. El procedimiento de purificación del RNA se realizó por el método de “Tri-reagent”, atendiendo a las recomendaciones del fabricante (Sigma). Al finalizar ese procedimiento se determinó la concentración del RNA mediante espectrofotometría a 260 nm. La reacción enzimática para retrotranscribir el RNAm a DNA complementario se hizo en ciclador térmico (Eppendorf Mastercycler); para ello se tomaron 2 µg de RNA total y se incubaron con el tampón del juego comercial para reverso transcripción RNA PCR core kit (ABI), siguiendo instrucciones del fabricante. La reacción enzimática ocurrió a 42 °C durante 45 minutos.

La expresión del IGF-1 se monitoreó por PCR los siguientes oligonucleótidos: sentido 5' TGA GCT GGT GGA CGC TCT TCA GT 3' y antisentido 3' TCT CTG AAA TGG TAT TGA ACT CA5'. Para normalizar los resultados, se usó como control de expresión constitutiva el gen de la enzima gliceraldehído 3'fosfato deshidrogenasa (GPDH) utilizando los siguientes oligonucleótidos: sentido 5' ATC TCT GCC CCC TCT GCT GAT 3' y antisentido 3' AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT 5'. El PCR se programó para comenzar con 4 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos cada uno constituido por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C, y por último terminó con 5 minutos a 72 °C. Los productos de los PCR para el IGF-1 y GPDH se visualizaron en gel de agarosa a 1,5 %, y se digitalizaron. La intensidad de las bandas de los productos de PCR se analizó con el programa *Molecular Analyst* (BioRad). Los niveles relativos del transcrito de IGF-1 se calcularon dividiendo entre los valores del transcrito de GPDH correspondiente. Los datos se representan como el porcentaje de incremento de los valores ajustados IGF-1/GPDH respecto al control sano.

5. 1. 8 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en los niveles séricos de malonildialdehído en los animales con EAE

El proceso de peroxidación lipídica se evaluó midiendo la concentración de malonildialdehído (MDA) utilizando un juego diagnóstico comercial (LPO-586 kit, Calbiochem). A los 30 días después de la primera inmunización, a las ratas del experimento de EAE moderada tratadas con la combinación EGF+GHRP₆, las del grupo control de vehículo y un grupo control sano, se les extrajo suero a partir del cual se hicieron las determinaciones. Este experimento se realizó atendiendo a las instrucciones de manufactura y de manera similar a lo que describe Esterbauer y Cheeseman (359).

5. 2 Resultados

5. 2. 1 Efectos de los tratamientos con EGF, GHRP₆ y EGF+GHRP₆ en el modelo de EAE moderada

La mejoría clínica en el grupo tratado con la combinación EGF+GHRP₆ se evidenció por la reducción del índice clínico (dos veces menor que el del grupo control de vehículo). El valor más bajo del índice clínico individual se registró en el grupo EGF+GHRP₆ en el cual la proporción de animales no enfermos fue mayor (Tabla 3).

Tabla 3. Índice clínico e incidencia de EAE moderada después del tratamiento con EGF+GHRP₆, EGF, GHRP₆ y control de vehículo

Grupos	N	Incidencia de EAE (%)	Índice Clínico	
			Promedio §	Máximo
EGF 200 µg/kg	12	11/12 (91 %)	0.93	5
GHRP ₆ 660 µg/kg	12	10/12 (83 %)	1.45	4
EGF+GHRP ₆ 200 µg/kg-660 µg/kg	12	7/12 (58 %) ■	0.62 *	2*
Solución salina	12	12/12 (100 %)	1.43	5

§: Promedio del índice clínico en el día que se registró el puntaje más alto. * Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. ■ Prueba de χ^2 de comparación de porcentaje y prueba de Fisher. El asterisco y el símbolo ■ indican diferencias significativas.

De manera evolutiva, el índice clínico promedio fue más bajo en el grupo de la combinación EGF+GHRP₆ (Fig. 19).

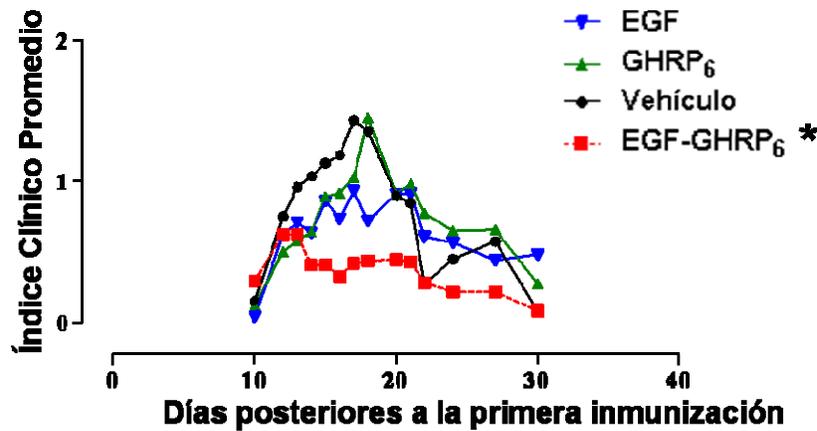


Figura 19. Evolución del índice clínico en los animales con EAE moderada tratados con EGF, GHRP₆, EGF+GHRP₆ y solución salina (0.9% NaCl- grupo control de vehículo). Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. El asterisco indica diferencia significativa.

Una vez que se estableció el efecto limitado del EGF y GHRP₆ como intervenciones terapéuticas individuales para las ratas del experimento de EAE moderada, el resto de los experimentos se realizaron con los animales tratados con la combinación terapéutica EGF+GHRP₆.

El efecto del tratamiento combinado con EGF+GHRP₆ fue dosis-dependiente. Los dos grupos de animales que recibieron las dosis más altas tuvieron una mejor evolución y un índice clínico menor que el grupo control de vehículo. En cambio, el grupo que se trató con la menor dosis no se diferenció del grupo control de vehículo (Fig.20).

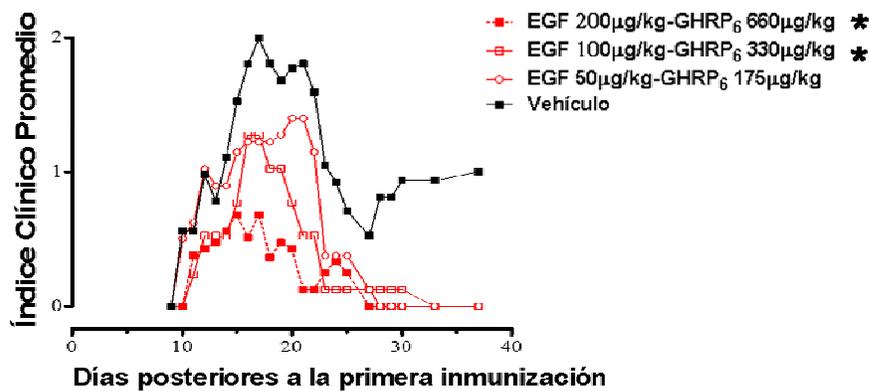


Figura 20. Curvas dosis-respuesta de EGF+GHRP₆ en los animales con EAE moderada comparados con el grupo control (vehículo). Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos indican diferencias significativas.

El análisis histológico demostró que los animales enfermos con EAE moderada exhibían los infiltrados inflamatorios alrededor de los vasos sanguíneos, independientemente del tratamiento recibido. Sin embargo, en el grupo EGF+GHRP₆ los focos inflamatorios fueron más pequeños. Solamente los grupos control de vehículo y GHRP₆ presentaron infiltrado inflamatorio en el parénquima cerebral (Fig.21).

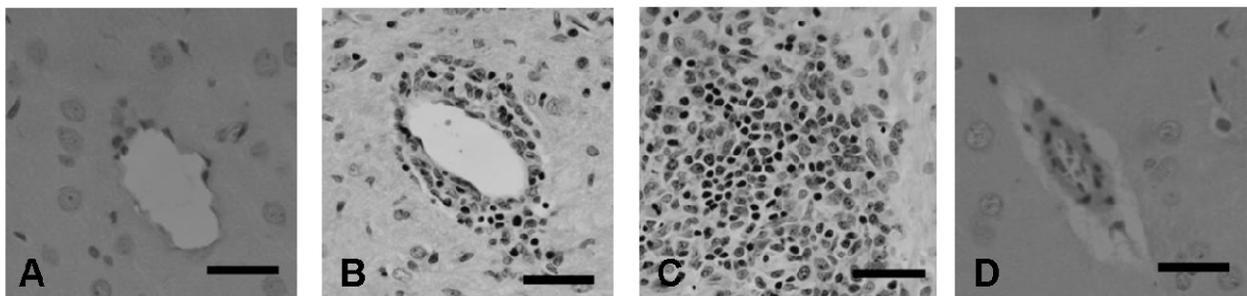


Figura 21. **A:** Vaso normal. **B y C:** Infiltrados inflamatorios perivascular e intraparenquimatoso representativos del grupo control de vehículo. **D:** Infiltrado inflamatorio representativo del grupo tratado con EGF+GHRP₆. La barra equivale a 50 μ m.

5. 2. 2 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en el modelo de EAE severa

El experimento que reproduce la forma más severa y compleja de EAE se realizó en ratones como un desafío adicional para explorar los efectos del tratamiento con EGF+GHRP₆. Se evaluaron dos estrategias farmacológicas: una terapéutica y una profiláctica-terapéutica. En los animales del grupo control de vehículo la enfermedad mostró un curso progresivo, sin remisiones y con un incremento sostenido del índice clínico promedio. Con la estrategia profiláctica-terapéutica se obtuvo la máxima protección, que preservó a los animales de las secuelas neurológicas severas y de la pérdida de peso observada en el grupo control de vehículo (Fig.22 A-B). El índice clínico promedio registrado a los 70 días de evolución indica que ninguna de las dos estrategias produjo una recuperación total, pero las secuelas neurológicas fueron menos que en el grupo control de vehículo. La mejoría clínica lograda con el tratamiento profiláctico-terapéutico se acompañó de una ganancia de peso significativa registrada el día 22

posterior a la primera inmunización, respecto al control de vehículo. Adicionalmente, la supervivencia fue superior en los grupos que recibieron los tratamientos con EGF+GHRP₆ (Fig. 22).

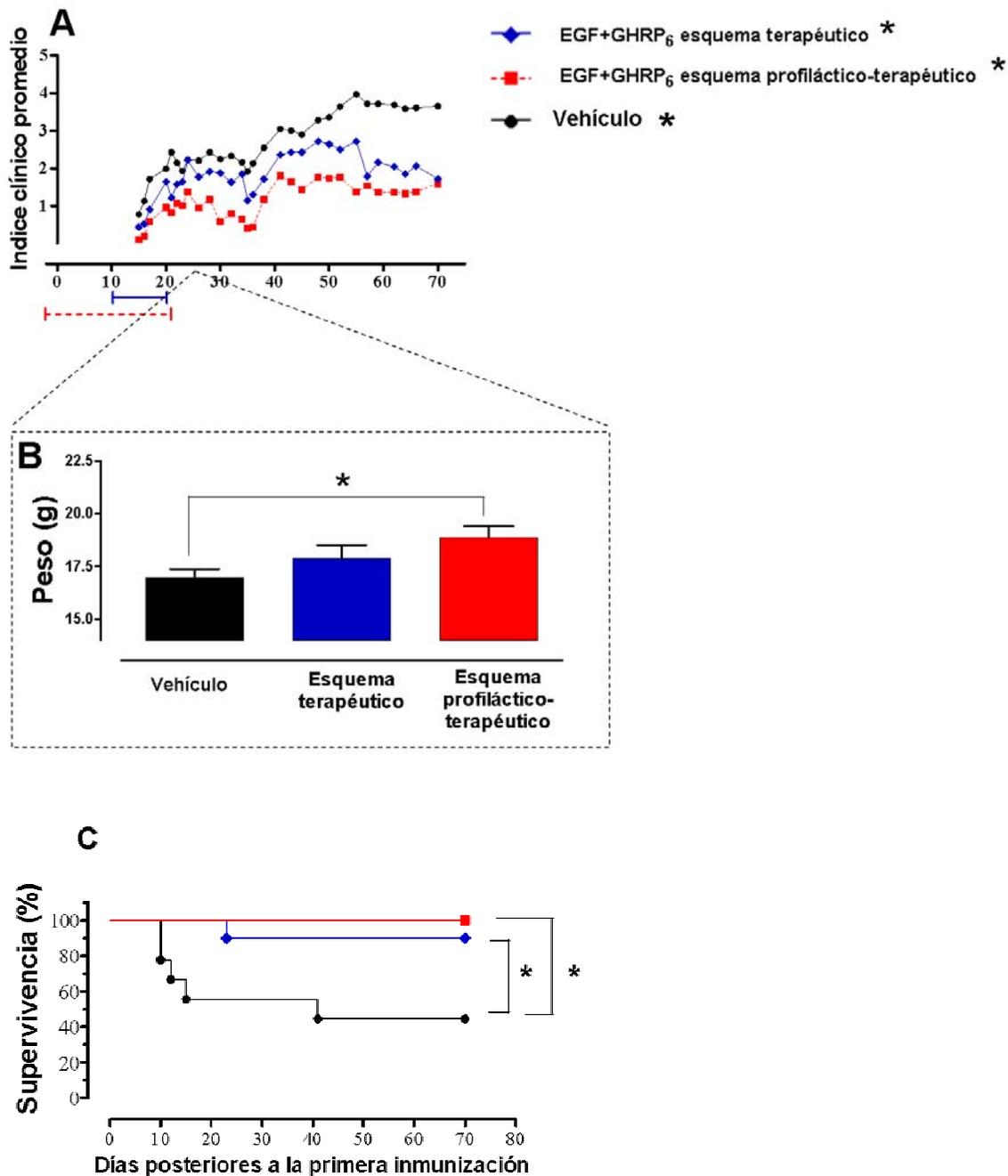


Figura 22. **A**: Evolución clínica de los grupos con EAE severa tratados con las dos estrategias farmacológicas: terapéutica y profiláctica-terapéutica. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. **B**: Registro del peso el día 22 posterior a la inmunización. ANOVA seguida de la prueba de Dunnett.

C: Curvas de supervivencia en el experimento de EAE severa. Prueba de log-rank. Los asteriscos indican diferencias significativas.

5. 2. 3 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en los niveles séricos de malonildialdehído

El tratamiento con EGF+GHRP₆ redujo el malonildialdehído sérico a niveles similares a los de control de animales sanos. En contraste, el grupo control de vehículo mostró un valor dos veces superior comparado con los animales tratados y los del grupo control sano (Fig.23).

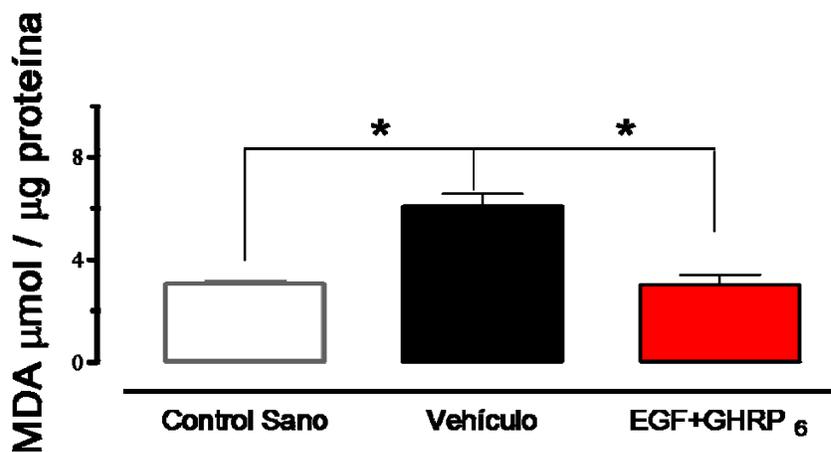


Figura 23. Concentración de malonildialdehído (MDA) en el suero de las ratas con EAE moderada tratadas con EGF+GHRP₆. ANOVA y Prueba de Dunnet. Los asteriscos indican diferencias significativas.

5. 2. 4 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en la expresión del transcrito de IGF-1 en cerebro

Los animales enfermos (grupo control de vehículo) y los enfermos tratados con EGF+GHRP₆ mostraron un incremento en los niveles del transcrito de IGF-1 en cerebro, con respecto al control sano. En el caso de los animales tratados con EGF+GHRP₆ el porcentaje de incremento en la expresión fue superior al del grupo control de vehículo (Fig.24).

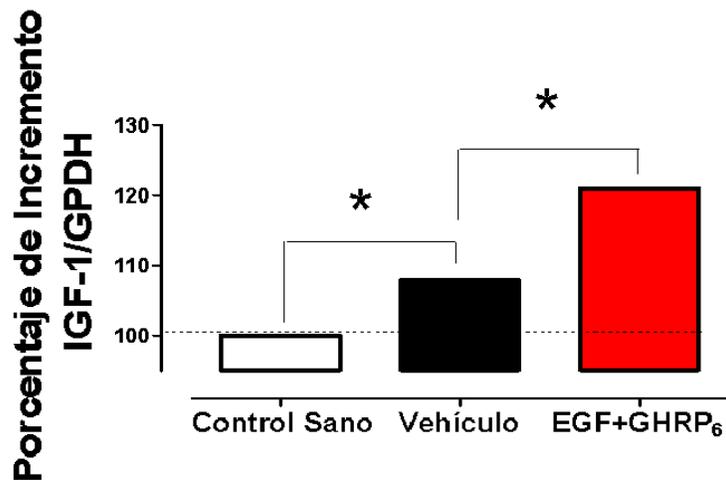


Figura 24: Comparación de los porcentajes de incremento del transcrito cerebral de IGF-1 en las ratas con EAE moderada 30 días después de la primera inmunización. Prueba de χ^2 de comparación de porcentajes. Los asteriscos indican diferencias significativas.

5. 3 Discusión

5. 3. 1 Efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ en modelos experimentales de Esclerosis Múltiple

La intervención terapéutica basada en la coadministración de EGF+GHRP₆ atenuó la severidad de la enfermedad tanto en la forma moderada como severa de EAE. Incluso en la forma severa de EAE, que es usualmente letal (360;361), la coadministración aumentó la supervivencia de los animales enfermos. En correspondencia con los resultados clínicos, los cambios morfológicos inducidos por las células inmunes autoreactivas fueron menos evidentes en el grupo tratado con la combinación EGF+GHRP₆. Los tratamientos con el EGF y el GHRP₆ por separado tuvieron un impacto terapéutico limitado en los parámetros clínicos y morfológicos.

El efecto de la combinación EGF+GHRP₆ pudiera deberse a la reducción de la citotoxicidad mediada por la peroxidación lipídica y al incremento local del IGF-1. En el caso de éste último, el nivel de expresión se mantuvo elevado aún después de finalizado el esquema de tratamiento.

Tanto para la EAE como para la Esclerosis Múltiple, los procesos patogénicos de peroxidación lipídica y biosíntesis de prostaglandinas que generan el malonildialdehído (362), se han invocado como uno de los pilares más relevantes de su fisiopatología (363-366). El hecho de que la intervención terapéutica basada en la combinación EGF+GHRP₆ redujera los niveles circulantes de malonildialdehído, sugiere que dicho tratamiento reduce la peroxidación lipídica y la biosíntesis de prostaglandinas o incrementa los niveles de los sistemas de defensa antioxidantes (por mecanismos no identificados hasta el momento).

El IGF-1 es uno de los factores de crecimiento más potentes por sus propiedades neuroprotectoras (283), y su deficiencia se ha considerado como un factor contribuyente en la fisiopatología de la Esclerosis Múltiple (367). En modelos de EAE el tratamiento con IGF-1 atenuó la sintomatología clínica, redujo el infiltrado inflamatorio y las lesiones debidas a la desmielinización (368). Como se ha mencionado en secciones precedentes de este trabajo, el GHRP₆ induce la expresión del IGF-1 en diversas células del sistema nervioso central (30;66) y sus efectos paracrinos pueden influir en neuronas y en células de la glía, facilitando sus funciones fisiológicas aún después de sufrir daños al sistema nervioso (283;286;287;369;370). Adicionalmente, el IGF-1 protege a las neuronas contra la toxicidad inducida por amino ácidos excitatorios y contra el estrés oxidativo, ambos elementos relevantes en el escenario fisiopatológico de la EAE (371;372). Otro de los efectos del IGF-1 que tiene particular importancia en EAE y Esclerosis Múltiple es la reducción de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad clase I (373;374), lo cual se traduce como efecto antiinflamatorio (368) con una repercusión terapéutica importante en Esclerosis Múltiple (375).

El hecho de que el GHRP₆ actúe en el sistema nervioso central como pro-hormona en la inducción del IGF-1 es relevante, porque esta respuesta *in situ* representa una ventaja si se compara con la administración exógena del IGF-1: su peso molecular relativamente grande y su limitada incorporación al sistema nervioso central conspiran contra su efecto terapéutico exitoso (376). Además, el IGF-1 expresado en cerebro elude la competencia sistémica que representan las proteínas de unión al IGF-1 (IGFBP), y de esa manera se

favorece su acción paracrina. En correspondencia con lo anterior, se ha descrito una fuerte correlación entre la severidad de la Esclerosis Múltiple y el nivel circulante de las IGFBP (367).

La inducción de hormona de crecimiento mediada por el GHRP₆, es otro elemento importante a considerar, pues en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con Esclerosis Múltiple se han encontrado bajos niveles de esta hormona (377). Además, la grelina, ligando natural de los receptores de secretagogos, de la cual el GHRP₆ es un análogo sintético (378), ha demostrado propiedades antiinflamatorias en el modelo de EAE, donde no solo mejoró la sintomatología clínica característica sino también el perfil de citocinas inflamatorias en la médula espinal (379).

La toxicidad mediada por el glutamato es uno de los elementos fisiopatológicos de la Esclerosis Múltiple (380;381). Otras acciones farmacológicas del GHRP₆ consisten en la activación del receptor CD36 (382), el cual está presente en las células del cerebro, donde cumple un papel importante tanto en la homeostasis como en la neuropatología (383) donde ha demostrado su habilidad para revertir la muerte celular inducida por glutamato (27).

Independientemente de las vías involucradas en las acciones farmacológicas del GHRP₆, este péptido constituye una molécula multifuncional para la atenuación de una variedad de componentes nocivos de la cascada de daño que se produce en la Esclerosis Múltiple.

El EGF como agente terapéutico no es una molécula ajena al sistema nervioso central, ya que se produce *in situ* y también atraviesa la barrera hematoencefálica (384;385). En pacientes de Esclerosis Múltiple se han descrito niveles reducidos de EGF en el líquido cefalorraquídeo (386). La deficiencia de EGF promueve la activación de caspasas que median la apoptosis *in vitro* en células precursoras de neuronas (23). Entre los efectos neuroprotectores del EGF están la inhibición de la neurotoxicidad mediada por radicales libres y productos de la peroxidación lipídica (24) y la activación de la capacidad

remielinizante y proliferativa del oligodendrocito (46;387-389). Después del daño al sistema nervioso, el EGF promueve la recuperación y la regeneración de oligodendrocitos en riesgo (390), lo cual favorecería el proceso de remielinización tan comprometido en Esclerosis Múltiple. Además, el tratamiento con EGF tiene otras implicaciones terapéuticas debido a su función en los eventos de neurogénesis (391-393), que facilitarían la regeneración de células dañadas de manera irreversible por el ataque autoinmune. Todo lo anterior sugiere que la administración exógena de EGF puede contribuir a la protección de las células del tejido nervioso y a facilitar los eventos de remielinización.

Tomando en consideración las evidencias referidas en este acápite, es posible pensar que los efectos farmacológicos del EGF y del GHRP₆, además del IGF-1 y la hormona de crecimiento inducidos, contribuyen a beneficiar el proceso de remielinización porque proporcionan un ambiente favorable a las células precursoras de los oligodendrocitos (390;394-396) y evitan la apoptosis (397).

Hasta el momento no existe una terapia efectiva para detener el curso de las diferentes formas clínicas de Esclerosis Múltiple y al mismo tiempo regenerar los tejidos afectados por el daño autoinmune. El tratamiento combinado con EGF+GHRP₆ pudiera resultar beneficioso porque ambos tienen propiedades citoprotectoras similares y exclusivas, que convergen en determinados blancos celulares, y cuyos efectos son aumentar la supervivencia de las células expuestas al daño, reducir la auto-reactividad y promover los mecanismos de reparación fisiológica.

Los resultados expuestos en esta sección apoyan la idea de que enfermedades complejas del sistema nervioso, como la Esclerosis Múltiple, demandan aproximaciones terapéuticas combinadas.

5. 4 Resumen de Resultados

- a) En el modelo de EAE moderada el EGF y el GHRP6 por separado no produjeron beneficio terapéutico.
- b) En el modelo de EAE moderada el tratamiento con la combinación EGF+GHRP6 redujo las manifestaciones clínicas y redujo la inflamación.
- c) En el modelo de EAE severa el tratamiento con la combinación EGF+GHRP6 redujo las manifestaciones clínicas, redujo las secuelas neurológicas y prolongó la supervivencia.
- d) En el modelo de EAE moderada el efecto del tratamiento con la combinación EGF+GHRP6 se asoció con una reducción de los niveles séricos de malonildialdehído y un incremento en los transcritos del IGF-1.

6. EFECTOS DEL EGF, GHRP₆ Y DE LA COMBINACIÓN EGF+GHRP₆ EN MODELOS DE ISQUEMIA REPERFUSIÓN COMO EJEMPLO DE ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

6. 1 Materiales y Métodos

6. 1. 1 Animales de experimentación

Se emplearon gerbos de Mongolia (Cenp/Mongolian gerbil), obtenidos de la División de Animales Gnotobióticos del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba). Estos experimentos se realizaron en el CIGB, Habana, Cuba. Se utilizaron gerbos machos, con un peso corporal entre 60 y 80 g. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento antes y después de la cirugía y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

6. 1. 2 Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con hidrato de cloral (400 µg/ kg). La temperatura rectal se controló durante todo el procedimiento, manteniéndola en $37 \pm 0.5^\circ$ C mediante una manta y un controlador de temperatura "Digisense" (Cole-Parmer, Barnant Company, USA). El modelo de isquemia cerebral se llevó a cabo según el método de Butterfield y McGraw (398). Con el animal en decúbito supino se realizó una incisión de aproximadamente 1 cm en la línea media del cuello, a partir de la horquilla esternal. Con ayuda de un microscopio quirúrgico, se localizaron las arterias carótidas comunes, identificadas por su carácter pulsátil, color rosado nácar y la presencia del nervio vago adherido a su cara externa. Se procedió a ocluir las arterias carótidas comunes empleando pequeñas pinzas. Al cabo del tiempo establecido de isquemia en cada experimento se retiraron las pinzas y se verificó visualmente la normalización del flujo sanguíneo carotídeo.

6. 1. 3 Grupos experimentales

Se emplearon dos modelos de isquemia cerebral global, uno severo inducido con 20 minutos de oclusión de las arterias carótidas comunes y otro moderado con 15 minutos de oclusión.

Para el experimento de isquemia cerebral severa, de 20 minutos de oclusión, se establecieron cuatro grupos experimentales en base al tratamiento: EGF (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=12), GHRP₆ (660 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=12), EGF+GHRP₆ (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 660 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente) (n=12), y solución salina (control de vehículo) (n=15).

En el experimento de isquemia cerebral moderada, de 15 minutos de oclusión, igualmente se establecieron cuatro grupos experimentales: EGF (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=10), GHRP₆ (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=10), EGF+GHRP₆ (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente) (n=10), y solución salina (control de vehículo) (n=53).

El EGF y el GHRP₆ se diluyeron en solución salina estéril inmediatamente antes de su administración. En ambos modelos se estableció un quinto grupo experimental, el falso operado. A esos animales solamente se les aislaron las arterias carótidas comunes, y no recibieron tratamiento alguno (n=6).

Inmediatamente después de retirar las pinzas oclusivas, se inyectó la primera dosis. Las siguientes se inyectaron a los 30 minutos, 2 horas y 4 horas respectivamente, utilizando en todos los casos la vía intraperitoneal. El tratamiento se prolongó durante 3 días y se inyectaron dos dosis cada 12 horas los días 2 y 3 (Fig. 25).

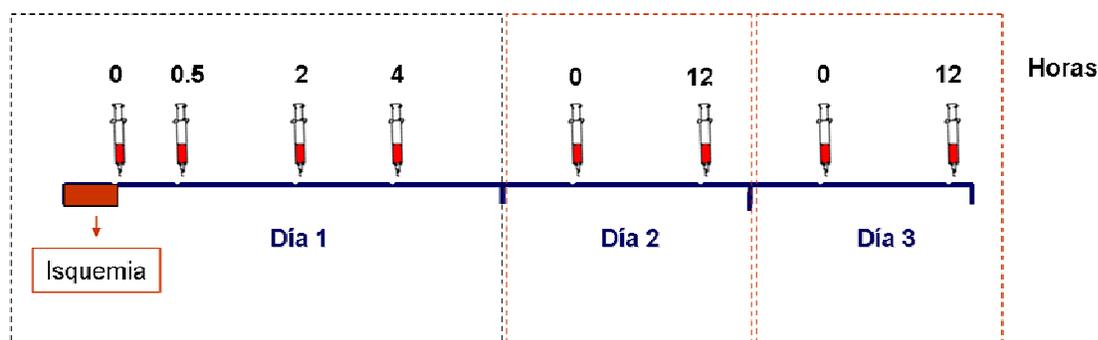


Figura 25. Esquema de administración de los tratamientos.

6. 1. 4 Evaluación del estado neurológico

Cada animal se examinó a las 24, 48 y 72 horas después de la perfusión, para determinar la presencia de signos clínicos de infarto. Se utilizaron los criterios modificados de P. Lawner para establecer una escala cuantitativa (399). A la puntuación

que alcanzó cada animal se le denominó Grado Neurológico (GN). Un animal puede alcanzar un grado neurológico máximo de 26 y mínimo de 0. El estado normal de cada condición se evaluó como 0 y no aparece en la tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Signos y condiciones analizados para determinar el grado neurológico (GN)

SIGNOS	PUNTOS	CONDICIONES
Ptosis palpebral	1	1 ojo semi-cerrado
	2	2 ojos semi-cerrados
	3	1 ojo completamente cerrado
	4	2 ojos completamente cerrados
Erizamiento	1	Pilo-erección en la cabeza o el lomo
Hipotonía	2	Una de las patas delanteras
Disminución de la fuerza de agarre	4	Ambas patas delanteras
Hiporreflexia	2	Una de las patas traseras
Disminución del reflejo flexor ante el estiramiento	4	Ambas patas traseras
Postura	3	Cabeza ladeada, cuerpo en forma de C
Marcha	2	Lenta
	3	Marcha circular o giros
	4	No camina
Actividad General	2	Hiperactivo
	2	Hipoactivo
	6	Postración extrema

6. 1. 5 Caracterización del polígono de Willis en los animales de experimentación

A las 72 horas de la intervención quirúrgica los gerbos se anestesiaron con hidrato de cloral (400 µg/kg), se perfundieron por vía transcardíaca con 20 ml de solución fisiológica, seguida por 25 ml de solución neutra de formaldehído al 10%. Inmediatamente se perfundieron con una solución de tinta china y gelatina al 7% para visualizar el árbol vascular (400). Los encéfalos se extrajeron y se fotografió la parte ventral con ayuda de microscopio quirúrgico a 2x de magnificación (Fig 26). Se caracterizó el estado de las anastomosis del polígono de Willis teniendo en consideración la ausencia o presencia unilateral o bilateral de estos vasos.

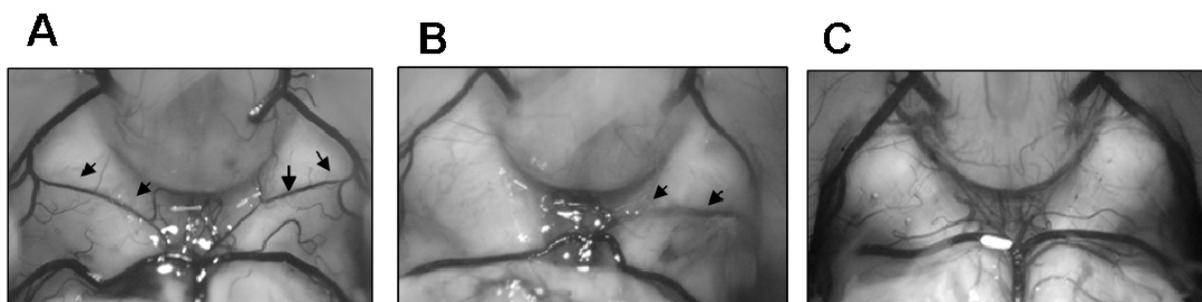


Figura 26. Variaciones en el polígono de Willis en los gerbos. **A:** Arterias comunicantes posteriores bilaterales. **B:** arteria comunicante posterior unilateral. **C:** ausencia de arterias comunicantes posteriores.

En el experimento de isquemia de 15 minutos se extrajeron los encéfalos de los animales y se realizaron cortes coronales de 2 mm de grosor, los cuales se incubaron en una solución de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC) al 0,5 % durante 20 minutos a 37°C. Esta sal de tetrazolio se reduce por enzimas mitocondriales a formazán, de color rojo intenso. Las zonas infartadas aparecen blancas (401). Para calcular el volumen de infarto los cortes teñidos se fotografiaron en un microscopio quirúrgico (magnificación 1x). En este experimento se hizo una caracterización cuantitativa del número de vasos comunicantes del polígono de Willis según la siguiente escala: 0=ausencia de arterias comunicantes posteriores; 1=arteria comunicante posterior unilateral; 2=arterias comunicantes posteriores bilaterales finas y 3= arterias comunicantes posteriores bilaterales gruesas. Posteriormente se estableció una correlación entre el grado de anastomosis del polígono de Willis y el grado neurológico.

En ambos experimentos los encéfalos de todos los animales se preservaron en la solución fijadora durante 1 semana para estudios histológicos.

6. 1. 6 Histología y morfometría

De las muestras de los experimentos de isquemia cerebral severa y moderada se tomaron dos secciones coronales del encéfalo: una aproximadamente a +0,3 de Bregma, y otra aproximadamente a -1,7 de Bregma. Las secciones se incluyeron en parafina, se hicieron cortes de 7 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La evaluación cualitativa de las láminas se realizó a ciegas, teniendo en cuenta estructuras como corteza parietal y temporal, hipocampo, núcleos del tálamo y núcleo caudado putamen, además de una valoración general de todo el corte. Para cada animal se registró la presencia de focos de infarto en ambos hemisferios y el total de focos de infarto por grupo experimental se comparó en cada una de las regiones analizadas.

Se determinó la densidad de neuronas normales (densidad neuronal) en las estructuras más afectadas: capas celulares superiores e inferiores de la corteza parietal, núcleo caudado putamen, hipocampo y núcleo ventral del tálamo. En cada una de las láminas se digitalizaron imágenes de cada zona anteriormente referida (Fig.27), a 40X de magnificación. El área total de cada imagen fue de 141 158 μm^2 para el experimento de isquemia cerebral severa y de 89 614 μm^2 en el experimento de isquemia moderada.

El conteo de neuronas se realizó utilizando el programa *Image J* (256). Se consideraron células normales las que cumplían los siguientes criterios: núcleo distinguible claramente con morfología elíptica o circular, cromatina laxa, nucleolo distinguible y ubicado hacia el centro del núcleo y ausencia de halo perinuclear o pericelular (246). Se calculó la densidad neuronal para cada región (neuronas normales/ mm^2).

Para el experimento de isquemia cerebral moderada de 15 minutos de oclusión, se calculó el volumen de infarto. Para ello se midió el área infartada en cada corte de 2 mm,

utilizando el programa *Image J* (256). El volumen de infarto se calculó según la siguiente fórmula:

Volumen de infarto = Área de infarto * Grosor del corte

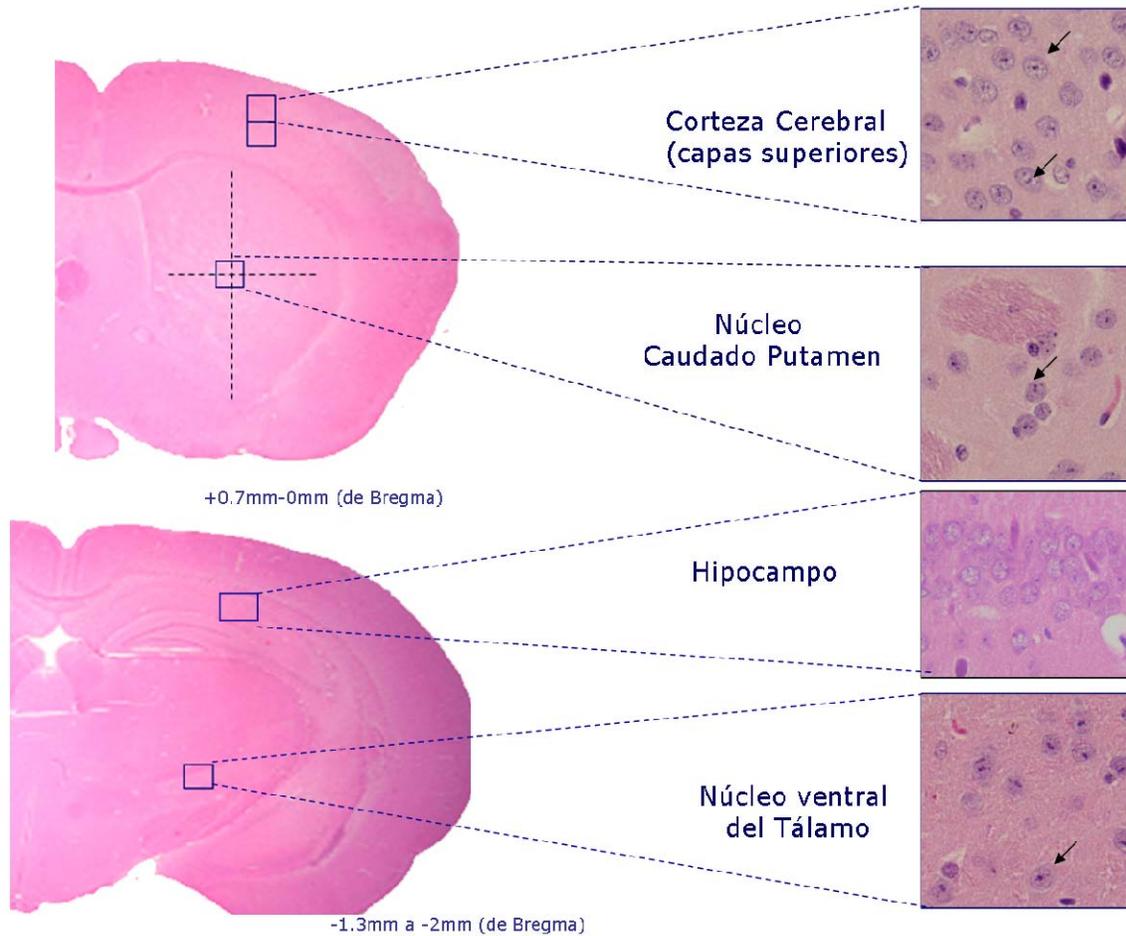


Figura 27: Representación gráfica del procedimiento utilizado en la selección del área a digitalizar para contar las neuronas normales. Las flechas negras señalan núcleos de neuronas normales.

6. 2 Efectos del EGF, GHRP₆ y la combinación EGF+GHRP₆ en los modelos de isquemia cerebral global

6. 2. 1 Modelo de isquemia cerebral global severo

6. 2. 1. 1 Mortalidad

El modelo de isquemia cerebral global de 20 minutos de oclusión presentó una alta mortalidad (40%), la cual no se redujo con ninguno de los tratamientos aplicados (Fig. 28 A).

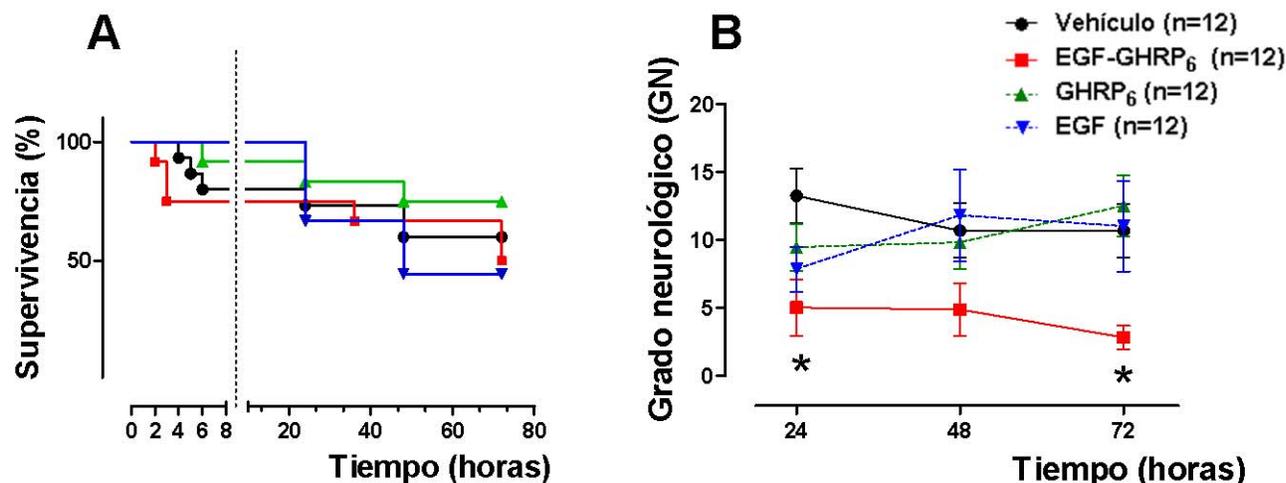


Figura 28. **A:** Curvas de supervivencia de los animales. Prueba de log rank. **B:** Evolución del grado neurológico. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos indican diferencias significativas.

6. 2. 1. 2 Grado neurológico

En los animales del grupo falso operado (no representado en los gráficos) no se registraron manifestaciones clínicas de daño cerebral. La afectación neurológica más representativa en los animales del grupo control de vehículo fueron los trastornos en la marcha, hipotonía de ambas patas delanteras, y postración extrema. La mejoría clínica en el grupo tratado con la combinación EGF+GHRP₆ se evidenció por la reducción del grado neurológico con respecto al resto de los grupos (Fig.28 B).

6. 2. 1. 3 Caracterización del polígono de Willis

De todos los gerbos estudiados el 59 % presentó arterias comunicantes posteriores bilaterales, un 19 % las tenía unilaterales, y en el 22 % restante no se constató la presencia de estos vasos (Tabla 5). Nótese que de manera casual el grupo control de vehículo resultó más favorecido que el resto en cuanto a la presencia de vasos comunicantes.

Tabla 5. Caracterización del polígono de Willis atendiendo al grupo experimental

Grupo experimental	Arterias Comunicantes Posteriores			No útil
	Bilateral	Unilateral	Ausentes	
Solución salina	5	3	0	1
EGF+GHRP ₆	2	0	2	2
EGF	2	1	0	2
GHRP ₆	3	0	4	2
Falso Operado	4	2	0	2

6. 2. 1. 4 Efectos del EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆: Histología

Evaluación cualitativa

En los tejidos de los animales controles falsos operados se encontraron aisladas células picnóticas principalmente en corteza cerebral. En todos los animales del grupo control de vehículo se observaron áreas de infarto, con predominio bilateral. El infarto se identificó por la muerte de la mayoría de los elementos celulares, desmielinización, presencia de restos celulares y de zonas parcialmente vacías. La zona infartada se extendió a todas las regiones del hipocampo, a la corteza parietal y temporal, a núcleos del tálamo y caudado-putamen.

En el grupo tratado con la combinación EGF+GHRP₆ el 50 % de los animales no tenía áreas de infarto. En el resto de los animales de ese grupo el daño fue menor respecto al grupo control de vehículo y a los grupos tratados con EGF y GHRP₆ por separado (Fig.29).

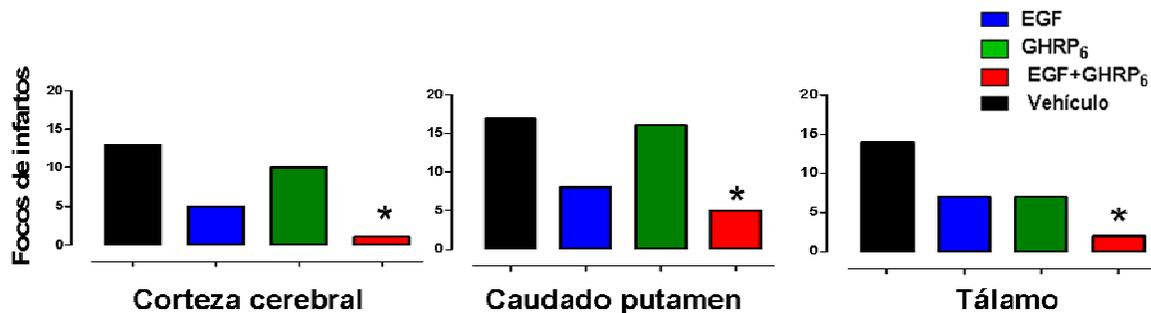


Figura 29. Presencia de focos de infartos en corteza cerebral, núcleo caudado putamen y tálamo. Prueba de X^2 y prueba de Fisher. Los asteriscos señalan diferencias con respecto al resto de los grupos.

Evaluación cuantitativa: análisis de la densidad neuronal

En los animales tratados con EGF+GHRP₆ la densidad neuronal se mantuvo normal en todas las regiones estudiadas, con excepción del hipocampo. La densidad neuronal disminuyó en los grupos control de vehículo y de GHRP₆ (Fig.30).

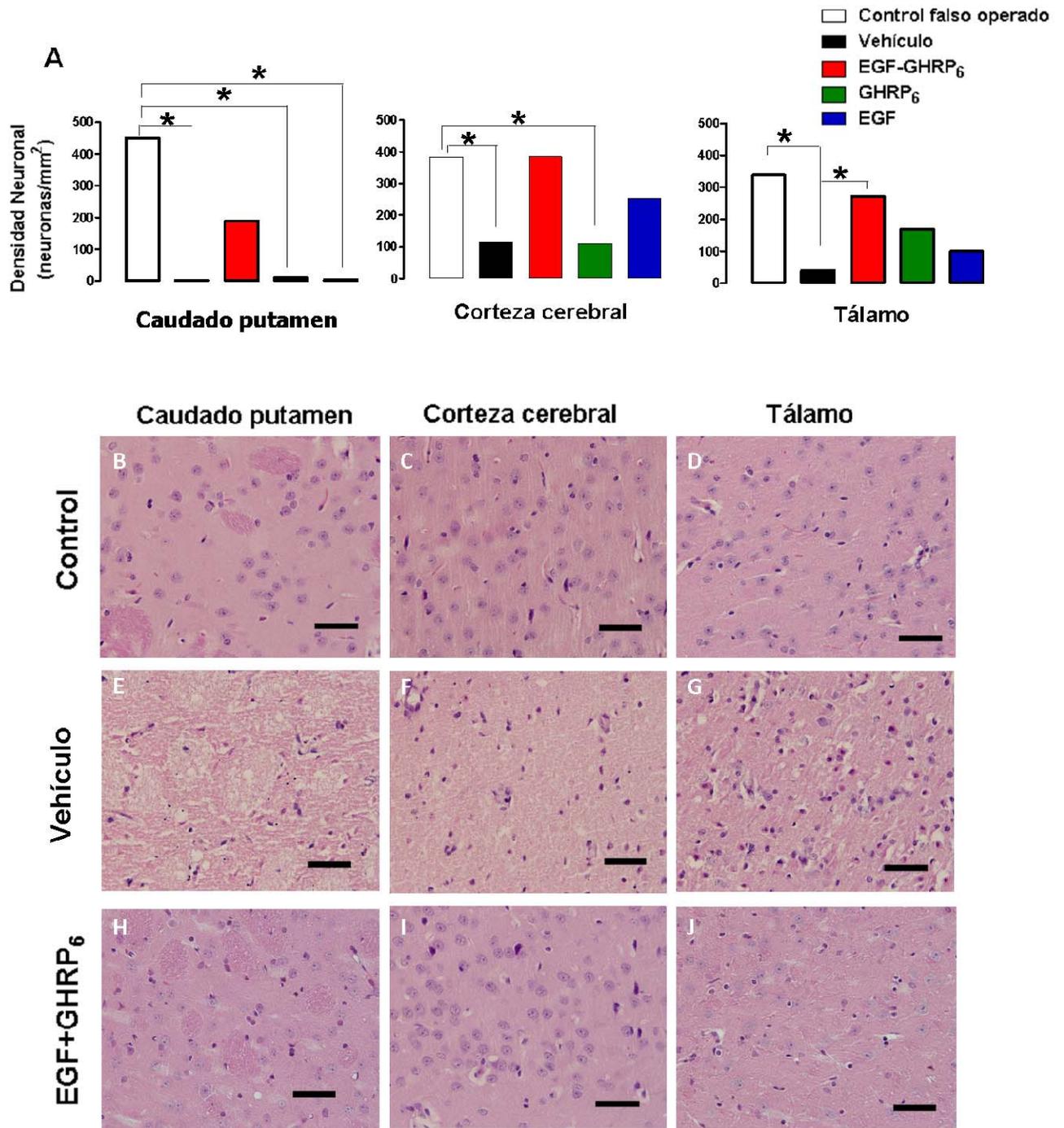


Figura 30. **A**: Densidad neuronal en corteza, núcleo caudado putamen y núcleo ventral del tálamo. Los datos representan las medianas. Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos señalan diferencias significativas. **B,E,H**: Imágenes representativas de las regiones caudado-putamen, **C,F,I**: corteza cerebral y **D,G,J**: tálamo, de los grupos experimentales. **B,C,D**: control falso operado. **E,F,G**: control de vehículo. **H,I,J**: EGF+GHRP₆. La barra negra en el extremo inferior derecho equivale a 50 μ m.

6. 2. 2 Modelo de isquemia cerebral global moderada

6. 2. 2. 1 Mortalidad

La mortalidad del grupo control de vehículo y del grupo tratado con el GHRP₆ fue de un 40%. En los grupos que recibieron la coadministración EGF+GHRP₆ y el EGF se registró un 100 % de supervivencia (Fig. 31 A).

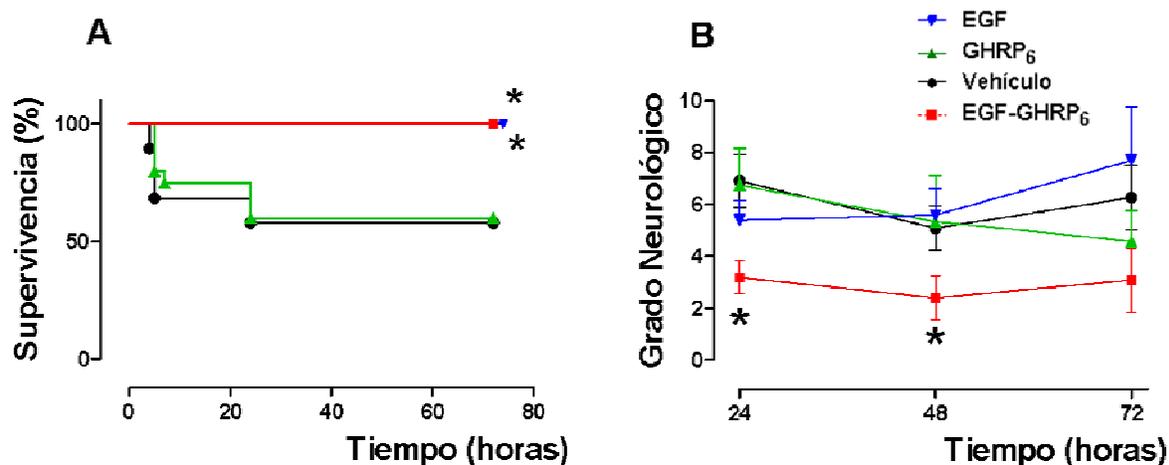


Figura 31. **A:** Curvas de supervivencia de los animales. Prueba de log rank. **B:** Evolución del grado neurológico. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos indican diferencias significativas.

6. 2. 2. 1 Grado neurológico

En este experimento las manifestaciones clínicas predominantes fueron la hipotonía, la hiperactividad y en menor grado los trastornos de la marcha. El grado neurológico del grupo tratado con la combinación fue menor en comparación al de los grupos EGF, GHRP₆ y control de vehículo a las 24 y 48 horas posterior a la reperfusion. (Fig. 31 B).

6. 2. 2. 3 Anatomía patológica

6. 2. 2. 3. 1 Caracterización del polígono de Willis

En la población de gerbos estudiada en este experimento un 49 % tenía arterias comunicantes bilaterales, un 47 % unilaterales y un 4 % carecía de estos vasos. Con estos datos se realizó un análisis de correlación entre el grado de anastomosis y el

grado neurológico y se demostró que en los animales de los grupos control de vehículo y EGF había una correlación inversa entre ambos parámetros. En el grupo que recibió la coadministración EGF+GHRP₆, no se evidenció esta correlación (Fig. 32).

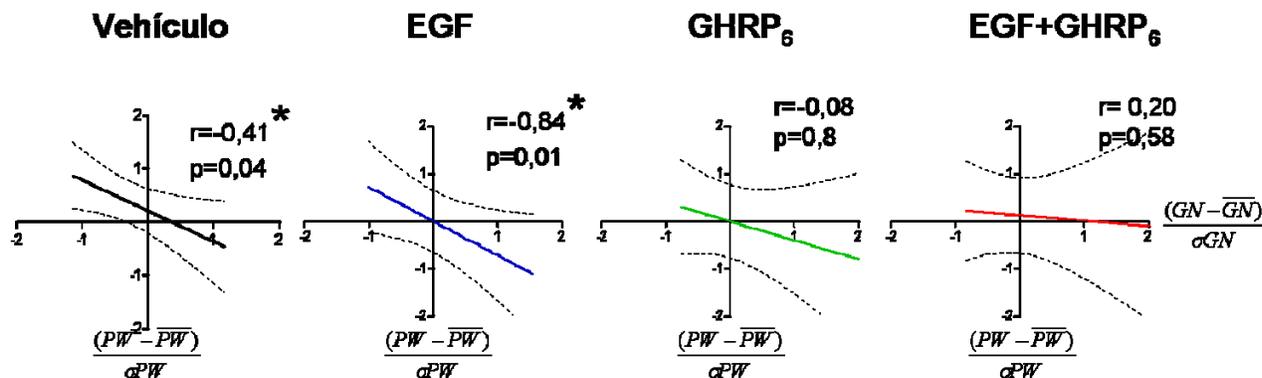


Figura 32: Correlación entre el grado neurológico (GN) y el número de arterias del polígono de Willis (PW) en cada grupo experimental del modelo de isquemia cerebral moderada. Prueba de correlación de Spearman. r: coeficiente de correlación de Spearman. Los asteriscos indican correlación significativa.

6. 2. 2. 3. 2 Volumen de infarto

En el grupo de animales falsos operados no se encontraron zonas infartadas. En los grupos control de vehículo, EGF y GHRP₆ los infartos se localizaron en corteza, núcleo caudado putamen e hipocampo. Los animales tratados con la combinación EGF+GHRP₆ no presentaron infartos ni en corteza cerebral ni en hipocampo, solo tuvieron infartos pequeños en el núcleo caudado putamen. El volumen de infarto calculado para todo el encéfalo fue significativamente menor en el grupo que recibió la coadministración EGF+GHRP₆ respecto al grupo control de vehículo (Fig. 33 A-B). El 96 % de los animales del grupo control de vehículo tuvo daño tisular y en el grupo tratado con la combinación el 50 % de los animales no tuvo infartos.

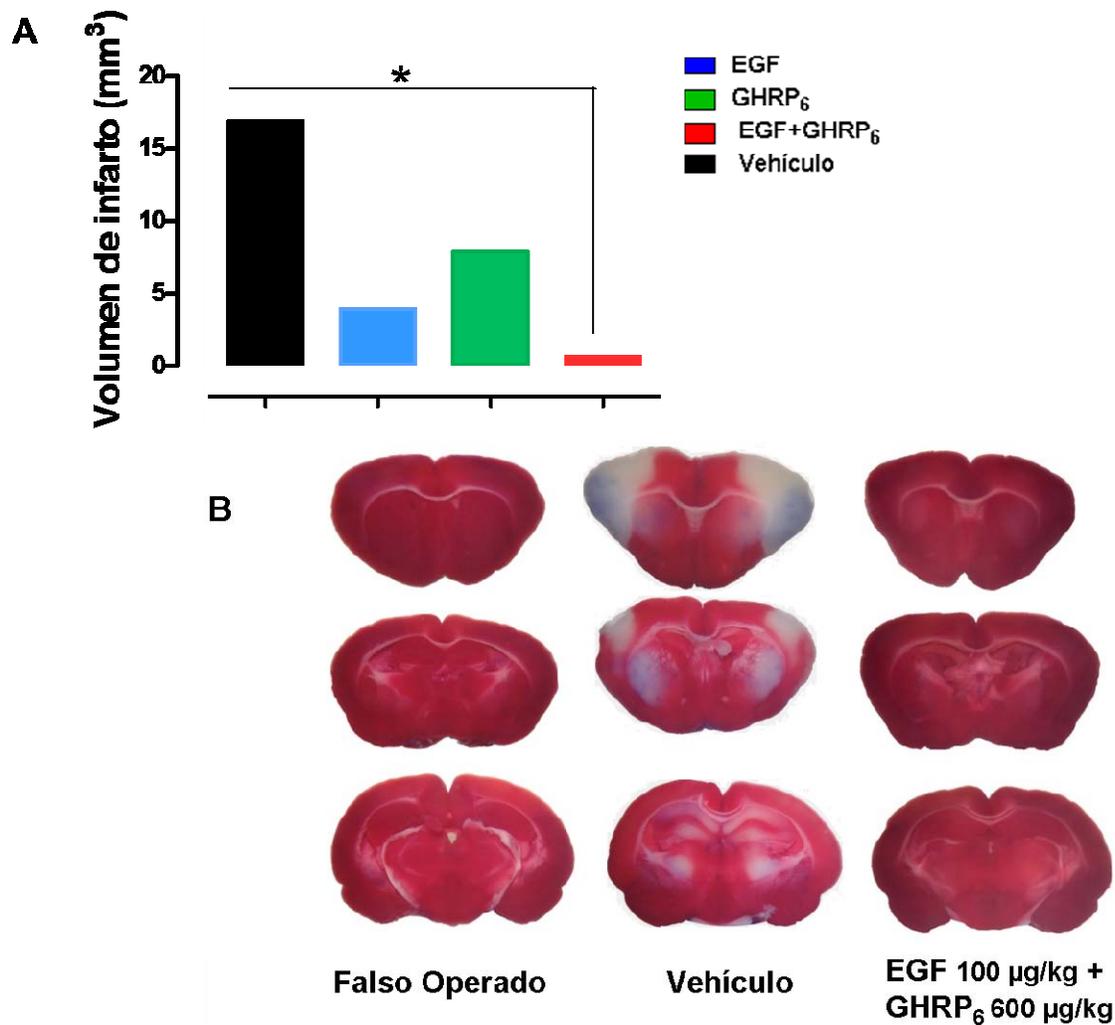


Figura 33. **A**: Volumen de infarto en los animales del modelo de isquemia cerebral moderada. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. El asterisco indica diferencia significativa. **B**: Cortes coronales del encéfalo teñidos con TTC.

6. 2. 2. 3. 3 Evaluación cuantitativa: análisis de la densidad neuronal

La densidad neuronal disminuyó en los grupos control de vehículo y GHRP₆ con respecto al control falso operado. En cambio, en los animales tratados con EGF+GHRP₆ la densidad neuronal se preservó en corteza cerebral, caudado putamen e hipocampo (Fig. 34).

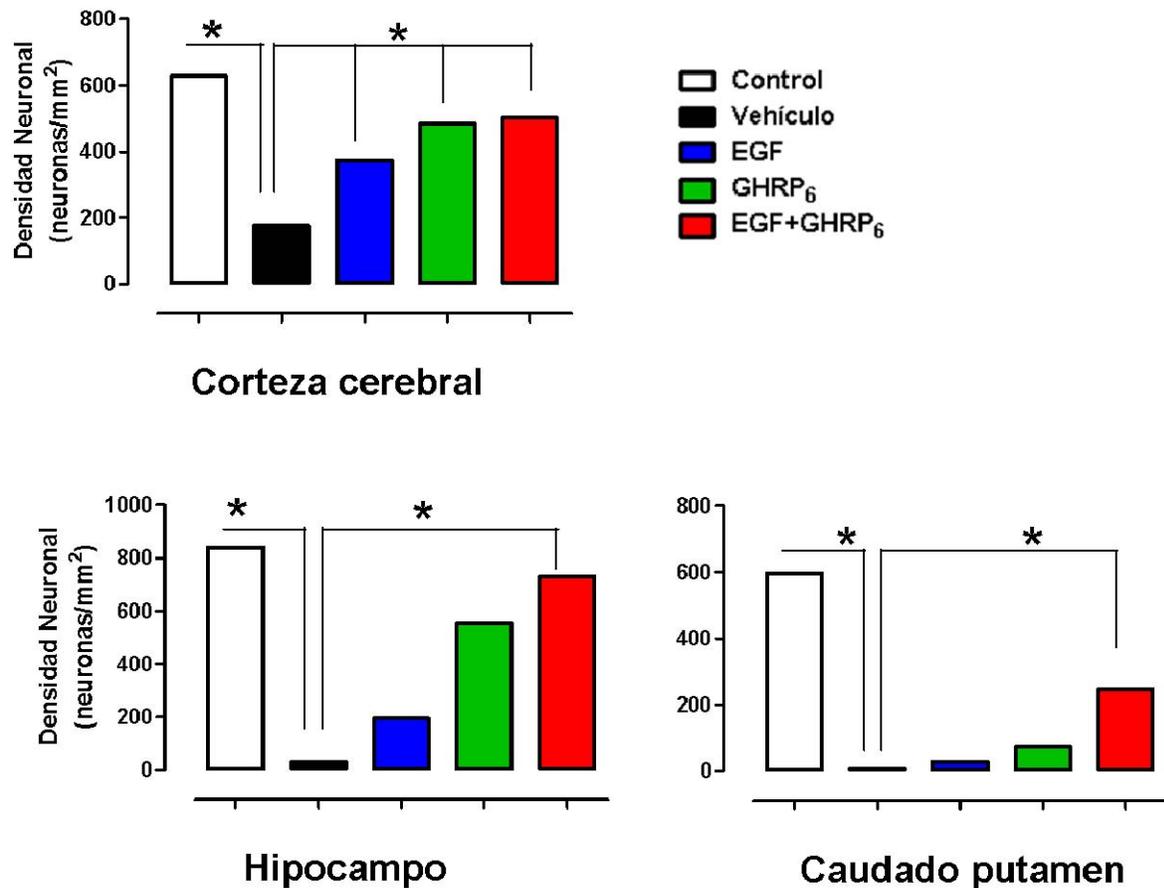


Figura 34. Densidad neuronal en corteza, núcleo caudado putamen e hipocampo. Los datos representan las medianas. Prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los asteriscos señalan diferencias significativas

6. 3 Discusión

6. 3. 1 Efectos del EGF, GHRP₆ y de la combinación EGF+GHRP₆ en los modelos de isquemia cerebral global severa y moderada

6. 3. 1. 1 Análisis clínico y anatomopatológico

Para la evaluación del efecto neuroprotector de la coadministración EGF+GHRP₆ se emplearon modelos experimentales de isquemia cerebral global moderada y severa, logrados a partir de diferentes tiempos de oclusión de las arterias carótidas comunes. Esto se hizo con el objetivo de comprobar la eficacia del tratamiento ante distintos

grados de isquemia y para reproducir en parte la variabilidad clínica de la enfermedad en el humano.

La mayoría de los estudios de isquemia cerebral que han usado como animal experimental el gerbil de Mongolia, utilizan como método la oclusión de las arterias carótidas comunes por periodos de 5 minutos (247;402-404), lo cual solo afecta a las neuronas del hipocampo (249). En un grupo de animales solo se produce daño unilateral y en otro grupo el daño es apenas perceptible (405).

La reproducibilidad de este modelo experimental está muy relacionada con la variabilidad del árbol vascular del polígono de Willis en los gerbos (ausencia de vasos comunicantes posteriores o presencia de estos de manera bilateral o unilateral) (400;405). Si antes se asumía el gerbil como animal carente de vasos comunicantes entre los sistemas arteriales carotídeo y vertebro-basilar, la contribución de Laidley y Seal (400;405) ha evidenciado que existen subpoblaciones con algún grado de anastomosis entre ambos sistemas. Esto explica por qué el modelo de isquemia en esta especie dejó de ser reproducible (405).

Sin embargo, la caracterización del polígono de Willis que se hizo en este trabajo permitió asegurar que los tiempos de isquemia utilizados en este estudio (15 y 20 minutos para modelo moderado y severo respectivamente), aún en presencia de ambas arterias comunicantes posteriores, producen un daño isquémico reproducible y confiable para la evaluación de candidatos terapéuticos: todos los animales del grupo control de vehículo en el modelo de isquemia severa y el 96 % de los animales del grupo control de vehículo en el modelo de isquemia moderada exhibieron infartos.

En contraste con el modelo de isquemia de 5 minutos, en este trabajo se demostró que con 15 y 20 minutos de oclusión de las arterias carótidas comunes hubo más daño y los modelos de infarto cerebral fueron más reproducibles, con lesiones predominantemente bilaterales.

Las neuronas más vulnerables al daño por isquemia de 20 minutos fueron las del hipocampo, la corteza cerebral, núcleo caudado putamen, y tálamo, en este orden. Todas estas regiones, excepto el hipocampo, se escogieron para el análisis de la densidad neuronal. La afectación del hipocampo fue masiva, y ninguno de los tratamientos aplicados modificó el daño neuronal.

En contraste con la isquemia de 20 minutos, en el modelo de isquemia moderada el tratamiento con EGF+GHRP₆ protegió las regiones de corteza cerebral y caudado putamen, y adicionalmente preservó la densidad neuronal en el hipocampo (Fig. 34). Esto es de particular importancia, porque los estudios de neuroprotección que solo evalúan el hipocampo como zona más vulnerable, utilizan modelos de oclusión de 5 o 10 minutos (247;404). El hecho de que la combinación EGF+GHRP₆ preservara las neuronas de esta estructura luego de 15 minutos de isquemia, constituye una evidencia adicional del efecto neuroprotector de la estrategia terapéutica propuesta en el presente trabajo.

La alta mortalidad observada en todos los grupos del modelo de isquemia severa (20 minutos) es similar a la descrita por otros autores que han usado el mismo tiempo (406), y refleja la severidad de las lesiones. En el modelo de isquemia moderada (15 minutos de oclusión) la mortalidad de los animales no tratados fue similar a la del modelo severo, pero en los sobrevivientes tanto el grado neurológico como la severidad de las lesiones fueron menores. Con el modelo de isquemia moderada se evidenció el efecto de la intervención farmacológica no solo en la clínica y en la protección del tejido nervioso, como ocurría en el modelo severo, sino también en la supervivencia de los animales.

Aunque ambos modelos fueron útiles para demostrar el efecto neuroprotector de la coadministración EGF+GHRP₆, en el modelo de isquemia severa la gravedad de las lesiones pudo haber determinado un efecto techo (407) que explicaría por qué ningún tratamiento mejoró la supervivencia. En cambio, el modelo de isquemia moderada evitó el efecto techo y permitió demostrar los beneficios de la combinación EGF+GHRP₆ sobre la supervivencia y sobre la protección de las áreas cerebrales.

En la práctica clínica no siempre existe una correlación entre la magnitud de la lesión y la morbilidad (408). La recuperación funcional es el criterio principal de evaluación para un candidato neuroprotector (409). Por eso, la reducción del volumen de infarto no se considera una evidencia robusta de efecto neuroprotector cuando no se asocia a mejoría clínica. Las recomendaciones del consorcio académico-industrial para el desarrollo farmacológico en isquemia cerebral (STAIR) establecen que en los estudios preclínicos el criterio más importante para demostrar neuroprotección es la correspondencia entre los resultados de la evaluación clínica y la morfológica (203;408). En los dos modelos de isquemia de este trabajo se evidenció una correspondencia entre los resultados anatomopatológicos (cualitativos y cuantitativos) y la evolución clínica, lo que constituye una prueba de principio a favor del efecto neuroprotector de la combinación EGF+GHRP₆.

El grado de anastomosis entre los sistemas vertebro-basilar y carotídeo no ha sido considerado previamente (al alcance de nuestra revisión bibliográfica) en la interpretación de los resultados de la evaluación de compuestos neuroprotectores en modelos de isquemia cerebral en gerbil (410-413). En este trabajo se correlacionó el grado de anastomosis del polígono de Willis con el grado neurológico y se demostró que existe una correlación negativa entre ambos parámetros, la cual se pierde con la intervención farmacológica EGF+GHRP₆ (Fig. 32). Esto último significa que la acción farmacológica de la combinación EGF+GHRP₆ elimina el efecto negativo de la carencia de vasos comunicantes.

6. 3. 1. 2 Terapia combinada como estrategia de neuroprotección en isquemia

Como son múltiples los mecanismos que provocan el daño neuronal posterior a la isquemia, es conveniente usar estrategias que actúen de manera simultánea sobre varios de estos mecanismos (408). La mejor estrategia de neuroprotección en isquemia cerebral requiere la combinación de múltiples drogas que, a diferentes niveles, bloqueen los eventos negativos de la cascada isquémica (159;414).

Los desaciertos en los estudios clínicos de neuroprotección en enfermedad cerebrovascular isquémica han creado una percepción desfavorable que, de alguna manera, ha ensombrecido el futuro de las investigaciones farmacológicas dirigidas a la protección cerebral posterior a la isquemia. En un análisis exhaustivo sobre cómo se habían diseñado las intervenciones terapéuticas para bloquear los mecanismos de muerte celular en la enfermedad cerebrovascular, se demostró que cada estudio se había dirigido a bloquear uno solo de los múltiples mecanismos de muerte celular (415).

En este trabajo, los resultados del grado neurológico y de las evaluaciones anatomopatológicas (cualitativas y cuantitativas) de los animales tratados con la combinación EGF+GHRP₆ evidenciaron un efecto neuroprotector que no se observó en los animales tratados solamente con EGF o con GHRP₆. El carácter neuroprotector de la combinación en el modelo de isquemia severa se reforzó al constatar, al final del experimento, que el grupo que recibió el tratamiento EGF+GHRP₆ tenía menos vasos comunicantes bilaterales que el grupo control de vehículo.

Después de un evento isquémico, al déficit de oxígeno y glucosa le acompaña el daño del endotelio, de los astrocitos, de los oligodendrocitos, y la activación de las microglías. (75). En este trabajo, además de la preservación de las neuronas que se logró con el tratamiento combinado EGF+GHRP₆, el resto de los elementos celulares del cerebro también se preservó. Esto es importante porque la viabilidad de las neuronas depende de la homeostasis que establecen con las glías y con el endotelio vascular (416).

La estrategia terapéutica representada por la combinación EGF+GHRP₆ está en correspondencia con la idea de que para proteger al sistema nervioso después de eventos isquémicos, los tratamientos tienen que proteger a los diferentes tipos de células del tejido nervioso (75;417). El beneficio terapéutico que se obtuvo coadministrando EGF y GHRP₆ se explica por el hecho de que ambas moléculas tienen propiedades que pueden proteger a las células del sistema nervioso. La amplia distribución de los

receptores celulares del EGF (45;290;418;419) y del GHRP₆ (25;55) en neuronas y glías es una prueba de ello.

Aunque no existen evidencias del uso del GHRP₆ en modelos de isquemia cerebral, se ha demostrado que la grelina, de la cual el GHRP₆ es un análogo funcional, reduce el tamaño de las zonas infartadas a través de una disminución del TNF α y de las enzimas relacionadas con la inducción de especies reactivas del oxígeno (iNOS) (420).

En modelos de isquemia cerebral empleando un solo fármaco, EGF(421) ó hexarelina (422), a través de la vía intracerebro-ventricular se demostró reducción del daño cerebral y atenuación de los signos clínicos (421;422). La vía intracerebro-ventricular garantiza la disponibilidad del fármaco en el parénquima cerebral, pero es poco usual por ser tan invasiva. Aunque la barrera hematoencefálica es permeable al EGF y a los péptidos secretagogos (385;423), esta permeabilidad es a través de un sistema de transporte saturable (384). Esto pudiera explicar por qué en los grupos experimentales de este trabajo, tratados solo con EGF o con GHRP₆ por vía sistémica, no se obtuvieron resultados similares a los que emplearon la vía intracerebro-ventricular (421;422).

Varios de los eventos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia y la reperfusión en el sistema nervioso central son blancos de los efectos citoprotectores del EGF y del GHRP₆. Entre ellos podemos citar el daño inducido por estrés oxidativo (24;355), la disfunción mitocondrial (424;425) y la excitotoxicidad mediada por el neurotransmisor ácido glutámico (27;311).

A continuación de los eventos de isquemia-reperfusión, se producen grandes cantidades de radicales libres y lipoperóxidos, productos responsables del edema cerebral y del daño neuronal (412). Las habilidades del EGF para proteger contra el daño oxidativo y suprimir la acumulación de los productos de la peroxidación lipídica explica el efecto citoprotector de esta molécula contra la muerte neuronal inducida por isquemia cerebral (24).

En cuanto al GHRP₆, se destaca su capacidad para reducir las especies reactivas del oxígeno, el malonildialdehído, los hidroperóxidos totales y preservar los sistemas de defensa anti-oxidantes fundamentalmente el de la enzima superóxido dismutasa (355). De forma indirecta el EGF interviene en la protección mitocondrial porque regula la expresión del factor nuclear eritroide-2 (Nrf-2) (424;426-428) y éste, como factor de transcripción, controla la expresión de un grupo de proteínas constitutivas que protegen a las mitocondrias contra el estrés oxidativo (429). Mucho antes de que la apoptosis inicie su etapa efectora mediada por caspasas, en la mitocondria ya se han producido alteraciones importantes que desequilibran las proteínas que controlan su integridad (Bcl-2 antiapoptótica y Bax proapoptótica). Una ventaja del efecto del EGF en relación con la integridad mitocondrial es la capacidad de inhibir la expresión de Bax y aumentar la expresión de Bcl-2 (430). Esta alternativa terapéutica dirigida a Bcl-2 y Bax como blancos pudiera resultar más efectiva que las estrategias de bloquear las caspasas porque el control de la apoptosis en una etapa temprana, como es la preservación de la integridad mitocondrial, resulta más efectivo que la inactivación de las caspasas como moléculas efectoras en un punto de no retorno.

Por su parte, el GHRP₆ inhibe las caspasas y bloquea el proceso de apoptosis característico de células neuronales senescentes (350). Todo lo anterior sugiere que la administración combinada del EGF y del GHRP₆ favorece el control de la apoptosis en dos niveles diferentes.

En el contexto de la isquemia cerebral el IGF-1 endógeno que se produce posterior a la coadministración del EGF+GHRP₆ pudiera tener efectos sinérgicos con el EGF exógeno y favorecer el control de la apoptosis de manera similar a lo descrito por Limesand y su grupo (397). Además, los efectos biológicos de la combinación EGF e IGF-1 evaluados en precursores neurales estimularon la supervivencia y la proliferación celular (354) lo cual pudiera ser muy favorable si tal efecto se reprodujera en el sistema nervioso central posterior al daño por isquemia-reperfusión.

El efecto neuroprotector de la combinación EGF+GHRP₆ después de la isquemia y la perfusión incluye la transducción y la activación de señales de supervivencia celular

(283;431). Uno de los receptores celulares más relevantes en la regulación de la supervivencia celular es el receptor de EGF. Las vías de transducción de señales activadas por su ligando natural, el EGF, incluyen las vías del PI3K/AKT, Ras/MAPK y JAK/STAT, las cuales confluyen en la activación de mecanismos de supervivencia celular (431). Por su parte, el GHRP₆, indirectamente a través de la inducción del IGF-1 (66), activa una de estas vías, la del PI3K (283). La activación de la vía del PI3K por la acción directa del EGF e indirecta del GHRP₆, contribuye a explicar por qué el efecto terapéutico de la combinación de estas moléculas es superior a los resultados con los principios activos independientes.

6. 4 Resumen de Resultados

- a) El modelo de isquemia cerebral global severa se acompañó de una alta mortalidad, que no se modificó por ninguno de los tratamientos empleados. En cambio, el modelo de isquemia cerebral moderado se acompañó de una alta mortalidad solo en los grupos control de vehículo y GHRP₆. Los grupos tratados con EGF o EGF+GHRP₆ tuvieron un 100% de supervivencia.
- b) En los dos modelos de isquemia cerebral severa y moderada el tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ produjo una mejoría significativa en el grado neurológico respecto al grupo control de vehículo y a los tratamientos con EGF y GHRP₆ de manera independiente.
- c) En ambos modelos de isquemia cerebral no hubo infartos en el 50% de los animales tratados con la combinación EGF+GHRP₆.
- d) En el modelo de isquemia cerebral severa la densidad neuronal se mantuvo normal en el grupo tratado con la combinación EGF+GHRP₆ y semejante a la del grupo control falso operado.
- e) En el modelo de isquemia cerebral moderada el tratamiento con la combinación EGF+GHRP₆ protegió todas las regiones: corteza cerebral, caudado putamen, tálamo e hipocampo.

7. DISCUSIÓN GENERAL

7. 1 Importancia de la terapia combinada en las enfermedades del sistema nervioso

La intervención farmacológica basada en la coadministración del EGF y del GHRP₆ mostró efecto neuroprotector en los modelos experimentales que reproducen condiciones degenerativas, inflamatorias e isquémicas del sistema nervioso. La demostración del efecto neuroprotector de la combinación EGF+GHRP₆ tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de enfermedades agudas y crónicas constituye una prueba de concepto robusta de la eficacia de esta alternativa terapéutica.

Muchos mecanismos fisiopatológicos son comunes en la Isquemia Cerebral, en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, Esclerosis Múltiple, en el daño secundario al trauma cerebral y medular, en la Epilepsia, e incluso en los trastornos psiquiátricos (432;433). El evento final, al que conducen esos mecanismos, es la muerte de neuronas, glías y de las células de los vasos que irrigan el cerebro (416). Por tal motivo, el éxito de las nuevas estrategias terapéuticas para las enfermedades del sistema nervioso dependerá de que se incluyan más blancos celulares, y se abandone la idea errónea de que solo importa la protección neuronal (434). Esto último exige un cambio de pensamiento que eleve la concepción de neuroprotección hacia un concepto más integrativo de cerebroprotección. La visión neurobiológica de las enfermedades del sistema nervioso deberá enriquecerse e incluir en los nuevos diseños experimentales y terapéuticos a todos los tipos celulares de la unidad neurovascular: neuronas, glías y elementos vasculares (75).

En este sentido, los tratamientos combinados tienen la ventaja de que pueden dirigirse hacia varias dianas terapéuticas simultáneamente. Los resultados de este trabajo pueden considerarse como un ejemplo de alternativa terapéutica combinada dirigida holísticamente a la cerebroprotección.

Muchos de los mecanismos de acción que sustentan los efectos de la coadministración de EGF+GHRP₆ en diferentes contextos experimentales de enfermedades del sistema

nervioso deben seguir investigándose. No obstante, esta aproximación terapéutica basada en el efecto combinado de EGF+GHRP₆ tiene la capacidad de promover mecanismos endógenos neuroprotectores al mismo tiempo que condiciona el escenario para facilitar el fenómeno de plasticidad neuronal.

7. 2 Potencialidades del EGF y del GHRP₆ como neuroprotectores: Racionalidad de la coadministración EGF+GHRP₆

El EGF ejerce efectos neuromoduladores sobre la mayoría de las neuronas del sistema nervioso, tanto sobre células en desarrollo como sobre neuronas postmitóticas, y promueve la diferenciación, la maduración y la supervivencia de éstas. La relevancia de este factor de crecimiento en el sistema nervioso se evidencia por el hecho de que los animales genéticamente modificados, que carecen del receptor de EGF, mueren en el primer mes de vida a consecuencia de enfermedades neurodegenerativas (391).

Se ha demostrado que el TNF α tiene un papel relevante en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, degenerativas e isquémicas del sistema nervioso (178;435;436). La severidad de las lesiones y el curso tórpido de estas enfermedades están asociados a niveles altos del TNF α (437;438). Uno de los efectos citoprotectores del EGF es precisamente su capacidad para contrarrestar los efectos citotóxicos del TNF α (439;440): el EGF reprime la apoptosis inducida por esta citocina porque impide la liberación del citocromo c de la mitocondria e inhibe las caspasas (424;440).

En este sentido, es interesante analizar los resultados del grupo liderado por Scalabrino, que propone un mecanismo patogénico novedoso para la Neurodegeneración Subaguda Combinada, la cual anteriormente se explicaba por un déficit de vitamina B12. Estos autores demostraron que la patogenia de esta enfermedad consiste en una sobreproducción de la citocina TNF α y una reducción en la síntesis constitutiva del EGF (441) y que la carencia de la vitamina B12 afecta el eje EGF/ EGFR en el sistema nervioso (442). Lo anterior muestra la importancia del EGF como neuroprotector constitutivo.

Por último, es interesante señalar que la expresión aumentada del EGF es uno de los mecanismos fisiológicos endógenos que explican el efecto beneficioso del preconditionamiento isquémico cerebral (443), lo cual garantiza una reparación eficiente y la plasticidad necesaria para atenuar el efecto del insulto isquémico.

Entre los efectos neuroprotectores atribuidos al GHRP₆ se encuentran los mediados por el IGF-1 (30;66) y por la liberación de la hormona de crecimiento (307;444) (Fig.34). El IGF-1, tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos de Isquemia Cerebral, Esclerosis Múltiple y Esclerosis Lateral Amiotrófica, ha probado su carácter neuroprotector (70;353;370;445).

El carácter neuroprotector de la hormona de crecimiento se evidencia en varios contextos. Por ejemplo, su efecto anti-apoptótico es relevante durante la ontogenia de las células nerviosas de la retina (446) y su deficiencia es factor etiológico en enfermedades neurodegenerativas (447;448). El incremento endógeno de hormona de crecimiento que ocurre como respuesta a los eventos de isquemia cerebral (449-451) es otra prueba de su condición como neuroprotector.

La relevancia del eje hormona de crecimiento /IGF-1 ha trascendido a la biología del crecimiento y metabolismo corporal, y se extiende además a la fisiología del cerebro adulto (61). Los mecanismos anti-apoptóticos del IGF-1 y de la hormona de crecimiento son similares y se superponen (452). Esta redundancia de funciones biológicas dirigidas a preservar la supervivencia celular refuerza la importancia de la hormona de crecimiento y del IGF-1 en la homeostasia del sistema nervioso, y justifica la racionalidad para el uso del GHRP₆ en enfermedades neurodegenerativas (Fig. 35).

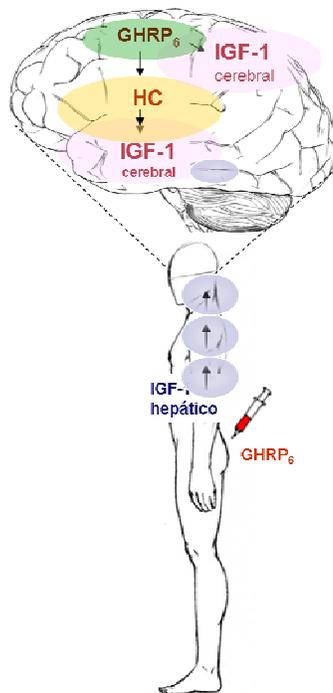


Figura 35. El GHRP₆ induce la expresión de la hormona de crecimiento (HC), que a su vez induce la expresión del IGF-1 en el hígado y en el cerebro. También el GHRP₆ directamente promueve la expresión del IGF-1 en el cerebro. El GHRP₆, la hormona de crecimiento y el IGF-1 que se producen en el cerebro o en el hígado, tienen efectos neuroprotectores.

Existen mecanismos endógenos de neuroprotección que se activan ante diferentes situaciones patológicas del sistema nervioso, aumentando el umbral de tolerancia al daño y la supervivencia celular (453). La coadministración EGF+GHRP₆ tiene efectos que remedan esos mecanismos.

El preconditionamiento isquémico es uno de los eventos que suscitan la activación de los mecanismos endógenos de neuroprotección. El efecto neuroprotector del preconditionamiento isquémico ha sido evaluado satisfactoriamente en modelos animales de isquemia cerebral en los cuales se ha demostrado la producción endógena de EGF e IGF-1 por las células residentes (443). Además, en experimentos de isquemia cerebral se ha demostrado que los efectos beneficiosos del trasplante de células mesenquimales se relacionan con la liberación del EGF y del IGF-1 por esas células (454).

La producción de factores de crecimiento como respuesta ante el reto que representan el preconditionamiento isquémico o el trasplante de células mesenquimales, puede ser artificialmente reproducida mediante la administración exógena de estos compuestos, lo cual potenciaría los mecanismos neuroprotectores constitutivos.

Así, la imitación de los mecanismos neuroprotectores endógenos es una estrategia promisoriosa (455). En ese sentido los mecanismos de acción del EGF y del GHRP₆, remedan algunos de los mecanismos endógenos de neuroprotección porque estimulan la neurogénesis (28;389;451;456;457), intervienen en la regulación del metabolismo cerebral (43;288;391;458;459), reactivan las vías metabólicas que fueron neuroprotectoras durante la ontogenia (276;430;460) e inducen la expresión directa de otras proteínas devenidas en factores neuroprotectores como la hormona de crecimiento y el IGF-1 (50;66;307;350;444;461).

8. CONCLUSIONES

1. La coadministración de EGF+GHRP₆ produjo:

- Efecto neuroprotector en los modelos experimentales que reproducen la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la Esclerosis Múltiple y la Isquemia Cerebral Global
- Estimulación de las reacciones moleculares y bioquímicas que resultan de la activación fisiológica de mecanismos endógenos de neuroprotección
- Amplificación de los efectos citoprotectores (comunes o exclusivos) del EGF y del GHRP₆, produciendo un efecto terapéutico beneficioso, lo cual sugiere que, independientemente de la etiología de los desórdenes del sistema nervioso, los mecanismos de supervivencia celular pueden activarse mediante intervenciones farmacológicas complejas.

2. La combinación EGF+GHRP₆ tuvo efecto terapéutico ventajoso porque influyó simultáneamente en varios blancos celulares, moleculares y bioquímicos.

3. Los resultados de este trabajo llevan a pensar que el concepto de neuroprotección es insuficiente en el contexto de la biología del daño cerebral y que es necesario implementar una praxis más abarcadora que involucre la cerebroprotección.

9. RECOMENDACIONES

Algunas de las tareas a realizar para concluir la carpeta de experimentos preclínicos con vistas a iniciar la etapa de ensayos clínicos con la combinación EGF+GHRP₆ para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso serían:

1. Realizar estudios experimentales para determinar dosis efectiva mínima y esquemas de administración óptima de la combinación EGF+GHRP₆ así como para determinar la naturaleza de los mecanismos farmacológicos de la combinación (aditividad, sinergia o antagonismo)
2. Explorar, mediante estudios genómicos y proteómicos de alto flujo, la influencia de la combinación EGF+GHRP₆ en los perfiles de expresión relacionados con los eventos de inflamación, apoptosis, regeneración, estrés oxidativo, y mecanismos endógenos de supervivencia celular, entre otros
3. Evaluar los posibles efectos adversos de la combinación EGF+GHRP₆ en animales sanos
4. Profundizar en el estudio de la actividad antioxidante endógena promovida por la combinación EGF+GHRP₆
5. Evaluar los efectos concomitantes del tratamiento con EGF+GHRP₆ y las drogas habituales para el tratamiento de las enfermedades del sistema nervioso.

10. AUTOBIBLIOGRAFIA

10. 1 Artículos científicos relacionados con el tema de tesis

1. García del Barco D y Montero E. Redundant regulatory mechanisms in autoimmune diseases: The example of experimental autoimmune encephalomyelitis. ***Biotecnología Aplicada*** 2004; 21:202-212.
2. Diana García del Barco, Eduardo Pentón, Enrique Montero and Jorge Berlanga. Neuroprotective autoimmunity: Reappraising current therapeutic approach and future perspectives. ***Biotecnología Aplicada***. 2007 Vol. 24:117-121.
3. Diana García del Barco, Eduardo Pentón, Jorge Berlanga, Orla Hardiman and Enrique Montero Boosting controlled autoimmunity: a new therapeutic target for CNS disorders. ***Expert Review on Neurotherapeutic*** 8 (5) 819-825 2008.
4. García del Barco D., Pérez-Saad H., Rodríguez V., Marin, J., Martín J., Cibrian D., and Berlanga. Neuroprotective Properties of EGF and GHRP-6 in an animal model of axonal strangulation. ***J. Amyotrophic Lateral Sclerosis***, 2009, (Suppl 1); 10: 84.
5. Diana García del Barco; Héctor Pérez-Saad; Valia Rodríguez; Javier Marin; Viviana Falcón; Jorge Martín; Danay Cibrian, and Jorge Berlanga. Therapeutic effect of the combined use of growth hormone releasing peptide-6 and epidermal growth factor in an axonopathy model. ***Neurotoxicity Research*** (2011) 19: 195-209.
6. Diana Garcia del Barco Herrera, Enrique Montero, Rosa .M. Coro-Antich, Enma Brown, José Suarez-Alba , Laura Lopez , Nelvys Subirós and Jorge Berlanga Coadministration of Epidermal Growth Factor and Growth Hormone Releasing Peptide-6 Improves Clinical Recovery in Experimental Autoimmune Encephalitis. ***Restorative Neurology and Neuroscience***. (2011) 29 – 4 243-252.

10. 2 Artículos científicos no relacionados directamente con el tema de tesis

1. D. García del Barco, A. Rodríguez, E. Rodríguez, C. Tamayo, J.R. Fernández, M. Vázquez, M.P. Rodríguez y R. Lleonart. Co-amplificación del gen de la Eritropoyetina humana en células de Ovario de Hámster Chino (dhfr-) resistentes a methotrexate, 1999. ***Biotecnología Aplicada*** 1999; 16:232-235.

2. D. García del Barco, E. Riego and J de la Fuente. Different expression patterns for Type I Interferon gene promoters in fibroblastic CHO and embryonal carcinoma p19 cells. **J. Biochem. Mol. Biol. and Biophys.** 1999 Vol.3, No.3-4,
3. Jorge Berlanga, Danay Cibrian, Luis Guevara, Heberto Domínguez, Jose S. Alba, Alina Seralena, Gerardo Guillén, Ernesto López, Pedro López-Saura, Alberto Rodriguez, Brumny Pérez, Diana Garcia del Barco and Nelson S. Vispo. Growth-hormone-releasing peptide 6 (GHRP6) prevents oxidant cytotoxicity and reduces myocardial necrosis in a model of acute on myocardial infarction. **Clinical Science** (2007) 112, 241–250
4. Danay Cibrian, Hussam Ajamieh, Jorge Berlanga, Olga S. León, Jose S. Alba, Micheal J.-T. Kim, Tania Marchbank, Joseph J. Boyle, Freya Freyre, Diana Garcia del Barco, Pedro Lopez-Saura, Gerardo Guillen, Subrata Ghosh, Robert A. Goodlad and Raymond J. Playford. Use of growth-hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) for the prevention of multiple organ failure. **Clinical Science** (2006) 110, 563–573
5. Hodelin R., García del Barco D., and Zaldívar T. IV World Conference on Bioethics: Standing for the defense of human dignity. **Biotecnología Aplicada** (2006) Vol 23 No 1
6. Danay Cibrián, Jorge Berlanga, Luis Guevara, Juan Valiente, Gerardo E Guillén, Diana García del Barco, Olga Sonia León, Viviana Falcón, José Suárez. Cardiac and extracardiac cytoprotective effects of GHRP6. **Biotecnología Aplicada** 2008; Vol.25, No.3
7. Jorge Berlanga Acosta, Diana Garcia del Barco, Danay Cibrian Vera, William Savigne, Pedro Lopez-Saura, Gerardo Guillen Nieto and Gregory S Schultz. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. **International Wound Journal**, 2008. Volume 5 Issue 4, Pages 530 –539.
8. Jorge Berlanga-Acosta, Jorge Gavilondo-Cowley, Diana García del Barco-Herrera, Jorge Martín-Machado and Gerardo Guillen-Nieto. Epidermal Growth Factor (EGF) and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) as Tissue Healing Agents: Clarifying Concerns about their Possible Role in Malignant Transformation and Tumor Progression. **Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis.** (2011) 2:1 <http://dx.doi.org/4172/2157-2518.1000115>

10. 3 Patentes y certificados de autor de invención relacionados con el tema de tesis

1. Combination of EGF/GHRP-6 for neuroregeneration of central nervous system. European Patent EP1870106. Publication Date: 08.09.2006. International Filing Date: 24.02.2006. Concedida en la Union Europea, Rusia, Sudáfrica, China, etc.

García del Barco Herrera, Diana, Guillén Nieto, Gerardo, Enrique, Berlanga Acosta, Jorge Amador, Freyre Freya de Los Milagros, y colaboradores.

2. Pharmaceutical combination to treat tissue damage due to arterial blood flow failure. Jorge Berlanga Acosta, Gerardo E. Guillén Nieto, Diana Garcia del Barco Herrera, Julio Raul Fernandez Masso; y otros. Pub. No.WO/2002/053167. PCT Pub. Date Jul. 11, 2002. Concedida en la Union Europea, Rusia, China, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Reference List

- (1) Traystman RJ. Neuroprotection: introduction. *Stroke* 2010 Oct;41(10 Suppl):S63.
- (2) Sattelmair JR, Kurth T, Buring JE, Lee IM. Physical activity and risk of stroke in women. *Stroke* 2010 Jun;41(6):1243-50.
- (3) Van der Walt A, Butzkueven H, Kolbe S, Marriott M, Alexandrou E, Gresle M, et al. Neuroprotection in multiple sclerosis: a therapeutic challenge for the next decade. *Pharmacol Ther* 2010 Apr;126(1):82-93.
- (4) Petratos S, Azari MF, Ozturk E, Papadopoulos R, Bernard CC. Novel therapeutic targets for axonal degeneration in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010 Apr;69(4):323-34.
- (5) Distad BJ, Meekins GD, Liou LL, Weiss MD, Carter GT, Miller RG. Drug therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2008 Aug;19(3):633-xii.
- (6) Woodruff TM, Thundiyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 2011;6(1):11.
- (7) Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 2010 Mar 1;48(5):629-41.
- (8) Lassmann H. Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis: What are the targets for therapy. *J Neurol Sci* 2010 Aug 16.
- (9) Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001 Aug;251(4):179-84.
- (10) Hamed SA. The multimodal prospects for neuroprotection and disease modification in epilepsy: relationship to its challenging neurobiology. *Restor Neurol Neurosci* 2010;28(3):323-48.
- (11) Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008 Sep;55(3):363-89.
- (12) 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.
- (13) Berlanga J, Lodos J, Lopez-Saura P. Attenuation of internal organ damages by exogenously administered epidermal growth factor (EGF) in burned rodents. *Burns* 2002 Aug;28(5):435-42.
- (14) Berlanga J, Prats P, Ramirez D, Gonzalez R, Lopez-Saura P, Aguiar J, et al. Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage. *Am J Pathol* 2002 Aug;161(2):373-9.
- (15) Caballero ME, Berlanga J, Ramirez D, Lopez-Saura P, Gonzalez R, Floyd DN, et al. Epidermal growth factor reduces multiorgan failure induced by thioacetamide. *Gut* 2001 Jan;48(1):34-40.

- (16) 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.
- (17) Rico M, Lorenzo MT, Pazo JA, Vega FV, De la Cruz LF. GHRP-6 in heifer and cow adenohypophysial cells separated by elutriation. *J Physiol Biochem* 1999 Mar;55(1):33-9.
- (18) Chen H, Liu B, Neufeld AH. Epidermal growth factor receptor in adult retinal neurons of rat, mouse, and human. *J Comp Neurol* 2007 Jan 10;500(2):299-310.
- (19) Jankovic BD, Radulovic J. Enkephalins, brain and immunity: modulation of immune responses by methionine-enkephalin injected into the cerebral cavity. *Int J Neurosci* 1992 Nov;67(1-4):241-70.
- (20) Mitchell V, Mazzuca M, Beauvillain JC. The fetal expression of proenkephalin mRNAs and Met-enkephalin immunoreactivity in the hypothalamoseptal tract and adjacent hypothalamic areas of the guinea pig brain. *Brain Res Dev Brain Res* 1995 May 26;86(1-2):67-80.
- (21) Xian CJ, Zhou XF. EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system. *Front Biosci* 2004 Jan 1;9:85-92.
- (22) Yves Charnay, Christian Paulin, Fernand Dray, Paul-Marie Dubois. Distribution of enkephalin in human fetus and infant spinal cord: An immunofluorescence study. *J Comp Neurol* 2004;223(3):415-23.
- (23) 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.
- (24) Peng H, Wen TC, Tanaka J, Maeda N, Matsuda S, Desaki J, et al. Epidermal growth factor protects neuronal cells in vivo and in vitro against transient forebrain ischemia- and free radical-induced injuries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998 Apr;18(4):349-60.
- (25) Delgado-Rubin A, Chowen JA, Argente J, Frago LM. Growth hormone-releasing peptide 6 protection of hypothalamic neurons from glutamate excitotoxicity is caspase independent and not mediated by insulin-like growth factor I. *Eur J Neurosci* 2009 Jun;29(11):2115-24.
- (26) 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.
- (27) 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.
- (28) Baldauf K, Reymann KG. Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res* 2005 Sep 21;1056(2):158-67.
- (29) Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci* 2007 Aug;10(8):990-1002.
- (30) 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.

- (31) Guan J. Insulin-like growth factor-1 and its derivatives: potential pharmaceutical application for ischemic brain injury. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008 Jun;3(2):112-27.
- (32) Ovbiagele B, Kidwell CS, Starkman S, Saver JL. Potential Role of Neuroprotective Agents in the Treatment of Patients with Acute Ischemic Stroke. *Curr Treat Options Neurol* 2003 Sep;5(5):367-75.
- (33) Lee DC, Fenton SE, Berkowitz EA, Hissong MA. Transforming growth factor alpha: expression, regulation, and biological activities. *Pharmacol Rev* 1995 Mar;47(1):51-85.
- (34) Barnard JA, Beauchamp RD, Russell WE, Dubois RN, Coffey RJ. Epidermal growth factor-related peptides and their relevance to gastrointestinal pathophysiology. *Gastroenterology* 1995 Feb;108(2):564-80.
- (35) Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000 Jul 3;19(13):3159-67.
- (36) Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 2005 Jul;12 Suppl 1:S17-S27.
- (37) Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 2000 Aug;22(8):697-707.
- (38) Sweeney C, Carraway KL, III. Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 2000 Nov 20;19(49):5568-73.
- (39) Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997 Oct 17;91(2):231-41.
- (40) Hatano E, Brenner DA. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 Dec;281(6):G1357-G1368.
- (41) Yamada M, Enokido Y, Ikeuchi T, Hatanaka H. Epidermal growth factor prevents oxygen-triggered apoptosis and induces sustained signalling in cultured rat cerebral cortical neurons. *Eur J Neurosci* 1995 Oct 1;7(10):2130-8.
- (42) Shen YM, Meltzer H, Saljooque F, HS U. Stimulation of the epidermal growth factor receptor induces glial-specific protein expression in the human DAOY neuroectodermal cell line. *Dev Neurosci* 2001;23(1):84-90.
- (43) Morrison RS, Kornblum HI, Leslie FM, Bradshaw RA. Trophic stimulation of cultured neurons from neonatal rat brain by epidermal growth factor. *Science* 1987 Oct 2;238(4823):72-5.
- (44) 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.
- (45) Kinoshita A, Yamada K, Hayakawa T, Kataoka K, Mushiroy T, Kohmura E, et al. Modification of anoxic neuronal injury by human recombinant epidermal growth factor and its possible mechanism. *J Neurosci Res* 1990 Mar;25(3):324-30.
- (46) Matthieu JM, Comte V, Tosic M, Honegger P. Myelin gene expression during demyelination and remyelination in aggregating brain cell cultures. *J Neuroimmunol* 1992 Oct;40(2-3):231-4.

- (47) Herzog C, Otto T. Regeneration of olfactory receptor neurons following chemical lesion: time course and enhancement with growth factor administration. *Brain Res* 1999 Dec 4;849(1-2):155-61.
- (48) 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 May;114(5):1537-45.
- (49) Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997 Oct;18(5):621-45.
- (50) Bowers CY. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci* 1998 Dec;54(12):1316-29.
- (51) Ghigo E, Arvat E, Gianotti L, Imbimbo BP, Lenaerts V, Deghenghi R, et al. Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Mar;78(3):693-8.
- (52) 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.
- (53) Smith RG, Sun Y, Betancourt L, Asnicar M. Growth hormone secretagogues: prospects and potential pitfalls. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004 Sep;18(3):333-47.
- (54) Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996 Aug 16;273(5277):974-7.
- (55) Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997 Aug;48(1):23-9.
- (56) Tannenbaum GS, Lapointe M, Beaudet A, Howard AD. Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1998 Oct;139(10):4420-3.
- (57) Lim E, Lee S, Li E, Kim Y, Park S. Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate-induced excitotoxicity via ERK1/2 and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathways. *Exp Neurol* 2011 Jul;230(1):114-22.
- (58) Lei T, Buchfelder M, Fahlbusch R, Adams EF. Growth hormone releasing peptide (GHRP-6) stimulates phosphatidylinositol (PI) turnover in human pituitary somatotroph cells. *J Mol Endocrinol* 1995 Feb;14(1):135-8.
- (59) Herrington J, Hille B. Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* 1994 Sep;135(3):1100-8.
- (60) Harakawa S, Yamashita S, Tobinaga T, Matsuo K, Hirayu H, Izumi M, et al. In vivo regulation of hepatic insulin-like growth factor-1 messenger ribonucleic acids with thyroid hormone. *Endocrinol Jpn* 1990 Apr;37(2):205-11.
- (61) 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.

- (62) Scheepens A, Williams CE, Breier BH, Guan J, Gluckman PD. A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13 Suppl 6:1483-91.
- (63) Han TR, Chun MH, Jang DH, Kim KS, Lim KH, Cho HJ. Neuroprotective effects of growth hormone against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: 1H magnetic resonance spectroscopic study. *J Korean Med Sci* 2007 Feb;22(1):122-6.
- (64) Shin DH, Lee E, Kim JW, Kwon BS, Jung MK, Jee YH, et al. Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 2004 Jan 2;354(1):64-8.
- (65) Muresanu DF, Sharma A, Sharma HS. Diabetes aggravates heat stress-induced blood-brain barrier breakdown, reduction in cerebral blood flow, edema formation, and brain pathology: possible neuroprotection with growth hormone. *Ann N Y Acad Sci* 2010 Jun;1199:15-26.
- (66) 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.
- (67) Johansson I, Destefanis S, Aberg ND, Aberg MA, Blomgren K, Zhu C, et al. Proliferative and protective effects of growth hormone secretagogues on adult rat hippocampal progenitor cells. *Endocrinology* 2008 May;149(5):2191-9.
- (68) Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, Behl C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 1999 Apr 2;274(14):9828-35.
- (69) Atkinson T, Whitfield J, Chakravarthy B. The phosphatase inhibitor, okadaic acid, strongly protects primary rat cortical neurons from lethal oxygen-glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Jan 16;378(3):394-8.
- (70) Lin S, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z. Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol* 2009 Jun;217(2):361-70.
- (71) Seigel GM, Chiu L, Paxhia A. Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs. *Mol Vis* 2000 Aug 31;6:157-63.
- (72) Wu XH, Yang SH, Duan DY, Cheng HH, Bao YT, Zhang Y. Anti-apoptotic effect of insulin in the control of cell death and neurologic deficit after acute spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2007 Sep;24(9):1502-12.
- (73) Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C, et al. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. *FASEB J* 2007 May;21(7):1393-402.
- (74) Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke* 2009 Mar;40(3 Suppl):S111-S114.
- (75) Lo EH. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br J Pharmacol* 2008 Mar;153 Suppl 1:S396-S405.

- (76) Fagan SC, Hess DC, Machado LS, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. Tactics for vascular protection after acute ischemic stroke. *Pharmacotherapy* 2005 Mar;25(3):387-95.
- (77) Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001 May 31;344(22):1688-700.
- (78) Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: a review of recent studies. *J Neurol Sci* 2001 Oct 15;191(1-2):3-9.
- (79) Li TM, Alberman E, Swash M. Clinical features and associations of 560 cases of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990 Dec;53(12):1043-5.
- (80) Zaldivar T, Gutierrez J, Lara G, Carbonara M, Logroscino G, Hardiman O. Reduced frequency of ALS in an ethnically mixed population: a population-based mortality study. *Neurology* 2009 May 12;72(19):1640-5.
- (81) Cozzolino M, Ferri A, Carri MT. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid Redox Signal* 2008 Mar;10(3):405-43.
- (82) Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:3.
- (83) Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993 Mar 4;362(6415):59-62.
- (84) Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande VC, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008 May;40(5):572-4.
- (85) Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011 Mar 12;377(9769):942-55.
- (86) Cifra A, Nani F, Nistri A. Riluzole is a potent drug to protect neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro from excitotoxicity due to glutamate uptake block. *Eur J Neurosci* 2011 Mar;33(5):899-913.
- (87) Rothstein JD, Van KM, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995 Jul;38(1):73-84.
- (88) Staats KA, Van Den Bosch L. Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival. *J Biol Phys* 2009 Oct;35(4):337-46.
- (89) Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 1995 Oct;38(4):691-5.
- (90) Ro LS, Lai SL, Chen CM, Chen ST. Deleted 4977-bp mitochondrial DNA mutation is associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hospital-based case-control study. *Muscle Nerve* 2003 Dec;28(6):737-43.
- (91) Kong J, Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 1998 May 1;18(9):3241-50.

- (92) Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996 Feb;39(2):203-16.
- (93) Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, et al. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;156(1):65-72.
- (94) Sasaki S, Iwata M. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1996 Aug;47(2):535-40.
- (95) McCombe PA, Henderson RD. The Role of Immune and Inflammatory Mechanisms in ALS. *Curr Mol Med* 2011 Apr 1;11(3):246-54.
- (96) Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 2004 Feb;55(2):221-35.
- (97) Oppenheim RW. Neurotrophic survival molecules for motoneurons: an embarrassment of riches. *Neuron* 1996 Aug;17(2):195-7.
- (98) Guegan C, Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest* 2003 Jan;111(2):153-61.
- (99) Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006 Sep;7(9):710-23.
- (100) Bogaert E, d'Ydewalle C, Van Den Bosch L. Amyotrophic lateral sclerosis and excitotoxicity: from pathological mechanism to therapeutic target. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010 Jul;9(3):297-304.
- (101) Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD001447.
- (102) Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005 Jan 6;433(7021):73-7.
- (103) Pascuzzi RM, Shefner J, Chappell AS, Bjerke JS, Tamura R, Chaudhry V, et al. A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 2010 May 3;11(3):266-71.
- (104) Lou JS, Moore D, Gordon PH, Miller R. Correlates of quality of life in ALS: Lessons from the minocycline study. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11(1-2):116-21.
- (105) Mitchell JD, Wokke JH, Borasio GD. Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD002064.
- (106) Traynor BJ, Bruijn L, Conwit R, Beal F, O'Neill G, Fagan SC, et al. Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology* 2006 Jul 11;67(1):20-7.

- (107) Traub R, Mitsumoto H, Rowland LP. Research advances in amyotrophic lateral sclerosis, 2009 to 2010. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011 Feb;11(1):67-77.
- (108) Ramagopalan SV, Sadovnick AD. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2011 May;29(2):207-17.
- (109) Okuno T, Nakatsuji Y, Kumanogoh A. The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011 Mar 21.
- (110) Handel AE, Jarvis L, McLaughlin R, Fries A, Ebers GC, Ramagopalan SV. The epidemiology of multiple sclerosis in Scotland: inferences from hospital admissions. *PLoS One* 2011;6(1):e14606.
- (111) Bahreini SA, Jabalameli MR, Saadatnia M, Zahednasab H. The role of non-HLA single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* 2010 Dec 15;229(1-2):5-15.
- (112) Shahbazi M, Roshandel D, Omidnyia E, Rshaidbaghan A. Interaction of HLA-DRB1*1501 allele and TNF-alpha -308 G/A single nucleotide polymorphism in the susceptibility to multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2011 Feb 12.
- (113) Power C, Antony JM, Ellestad KK, Deslauriers A, Bhat R, Noorbakhsh F. The human microbiome in multiple sclerosis: pathogenic or protective constituents? *Can J Neurol Sci* 2010 Sep;37 Suppl 2:S24-S33.
- (114) Casiraghi C, Dorovini-Zis K, Horwitz MS. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2011 Jan;230(1-2):173-7.
- (115) Codarri L, Fontana A, Becher B. Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation. *Curr Opin Neurol* 2010 Jun;23(3):205-11.
- (116) Wu GF, Alvarez E. The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2011 May;29(2):257-78.
- (117) Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the New Player of Neuroinflammatory Process in Multiple Sclerosis. *Scand J Immunol* 2011 Feb 21.
- (118) Weber MS, Hemmer B. Cooperation of B cells and T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ* 2010;51:115-26.
- (119) Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010 Apr 15;221(1-2):7-14.
- (120) Musabak U, Demirkaya S, Genc G, Ilikci RS, Odabasi Z. Serum adiponectin, TNF-alpha, IL-12p70, and IL-13 levels in multiple sclerosis and the effects of different therapy regimens. *Neuroimmunomodulation* 2011;18(1):57-66.
- (121) Minagar A, Toledo EG, Alexander JS, Kelley RE. Pathogenesis of brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2004 Jul;14(3 Suppl):5S-10S.
- (122) Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999 Mar;103(6):807-15.

- (123) Minagar A, Ostanin D, Long AC, Jennings M, Kelley RE, Sasaki M, et al. Serum from patients with multiple sclerosis downregulates occludin and VE-cadherin expression in cultured endothelial cells. *Mult Scler* 2003 Jun;9(3):235-8.
- (124) Hartung HP, Kieseier BC. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 2000 Jul 24;107(2):140-7.
- (125) Nakahara J, Aiso S, Suzuki N. Autoimmune versus oligodendroglial pathology: the pathogenesis of multiple sclerosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010 Oct;58(5):325-33.
- (126) Leitner H. Influence of neurosteroids on the pathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 2010 Aug;75(2):229-34.
- (127) van HJ, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011 Feb;1812(2):141-50.
- (128) Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK, Krishnan KJ, Reynolds R, Howell O, et al. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2011 Mar;69(3):481-92.
- (129) Mertin J, Knight SC, Rudge P, Thompson EJ, Healy MJ. Double-blind, controlled trial of immunosuppression in treatment of multiple sclerosis. *Lancet* 1980 Nov 1;2(8201):949-51.
- (130) Lublin F. History of modern multiple sclerosis therapy. *J Neurol* 2005 Sep;252 Suppl 3:iii3-iii9.iii3-iii9.
- (131) Munschauer FE, III, Stuart WH. Rationale for early treatment with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Ther* 1997 Sep;19(5):868-82.
- (132) Pede PD, Visintini D, Telera A, Cucurachi L, Campanini C, Immovilli P, et al. Immunomodulatory effects of IFN-beta1a treatment alone or associated with pentoxifylline in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). *J Interferon Cytokine Res* 2005 Aug;25(8):485-9.
- (133) Teige I, Treschow A, Teige A, Mattsson R, Navikas V, Leanderson T, et al. IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2003 May 1;170(9):4776-84.
- (134) Arnason BG. Interferon beta in multiple sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996 Oct;81(1):1-11.
- (135) Jiang H, Milo R, Swoveland P, Johnson KP, Panitch H, Dhib-Jalbut S. Interferon beta-1b reduces interferon gamma-induced antigen-presenting capacity of human glial and B cells. *J Neuroimmunol* 1995 Aug;61(1):17-25.
- (136) Plosker GL. Interferon-beta-1b: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs* 2011 Jan 1;25(1):67-88.
- (137) Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Hohlfeld R. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. *Lancet Neurol* 2005 Sep;4(9):567-75.
- (138) Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol* 2003 May 1;170(9):4483-8.

- (139) Pjrek E, Winkler D, Dervic K, Aschauer H, Kasper S. Psychosis as a possible side-effect of treatment with glatiramer acetate. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005 Sep;8(3):487-8.
- (140) Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003 Nov;144(1-2):125-31.
- (141) Hong J, Li N, Zhang X, Zheng B, Zhang JZ. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 May 3;102(18):6449-54.
- (142) Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995 Jul;45(7):1268-76.
- (143) Larlori C, Gambi D, Lugaresi A, Patruno A, Felaco M, Salvatore M, et al. Reduction of free radicals in multiple sclerosis: effect of glatiramer acetate (Copaxone). *Mult Scler* 2008 Jul;14(6):739-48.
- (144) Leger OJ, Yednock TA, Tanner L, Horner HC, Hines DK, Keen S, et al. Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis. *Hum Antibodies* 1997;8(1):3-16.
- (145) Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992 Mar 5;356(6364):63-6.
- (146) Myers KJ, Witchell DR, Graham MJ, Koo S, Butler M, Condon TP. Antisense oligonucleotide blockade of alpha 4 integrin prevents and reverses clinical symptoms in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005 Mar;160(1-2):12-24.
- (147) Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003 Jan 2;348(1):15-23.
- (148) Rinaldi F, Calabrese M, Seppi D, Puthenparampil M, Perini P, Gallo P. Natalizumab prevents the accumulation of cortical lesions in relapsing remitting multiple sclerosis: a preliminary report. *Neurol Sci* 2011 Jan;31 Suppl 3:317-20.
- (149) Phillips JT, Giovannoni G, Lublin FD, O'Connor PW, Polman CH, Willoughby E, et al. Sustained improvement in Expanded Disability Status Scale as a new efficacy measure of neurological change in multiple sclerosis: treatment effects with natalizumab in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011 Mar 18.
- (150) Ghezzi A, Grimaldi LM, Marrosu MG, Pozzilli C, Comi G, Bertolotto A, et al. Natalizumab therapy of multiple sclerosis: recommendations of the Multiple Sclerosis Study Group-Italian Neurological Society. *Neurol Sci* 2011 Apr;32(2):351-8.
- (151) Wolfovitz E. [The pleiotropic effects of statins]. *Harefuah* 2005 Aug;144(8):577-82, 597.
- (152) Bosel J, Endres M. [Direct neuronal effects of statins.]. *Nervenarzt* 2005 Jul;.
- (153) Wang J, Xiao Y, Luo M, Zhang X, Luo H. Statins for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;(12):CD008386.

- (154) Zecca C, Petrini L, Limoni C, Staedler C, Gobbi C. Tolerability and acceptance of prolonged low/delayed mitoxantrone regimens in patients with worsening multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2011;65(1):40-5.
- (155) Correale J, Rush C, Amengual A, Goicochea MT. Mitoxantrone as rescue therapy in worsening relapsing-remitting MS patients receiving IFN-beta. *J Neuroimmunol* 2005 May;162(1-2):173-83.
- (156) Penton-Rol G, Cervantes-Llanos M, Cabrera-Gomez JA, Alonso-Ramirez R, Valenzuela-Silva C, Rodriguez-Lara R, et al. Treatment with type I interferons induces a regulatory T cell subset in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Int Immunopharmacol* 2008 Jun;8(6):881-6.
- (157) Cabrera-Gomez JA, Santana-Capote E, Echazabal-Santana N, Diaz dIF, Casanova M, Gomez L, et al. [Actual status of multiple sclerosis in Cuba. National cooperative group for the clinical trial "Recombinant interferon alpha-2b in multiple sclerosis"]. *Rev Neurol* 2000 Sep 1;31(5):482-93.
- (158) Penton-Rol G, Martinez-Sanchez G, Cervantes-Llanos M, Lagumersindez-Denis N, Acosta-Medina EF, Falcon-Cama V, et al. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 2011 Jan;11(1):29-38.
- (159) Shuaib A, Hussain MS. The past and future of neuroprotection in cerebral ischaemic stroke. *Eur Neurol* 2008;59(1-2):4-14.
- (160) Dirección nacional de registros médicos y estadísticas de salud. MINSAP. 2009.
- (161) de Jesus LJ, Valhuerdi A, Fernandez O, Llibre JC, Porto R, Lopez AM, et al. Prevalence of stroke and associated risk factors in older adults in Havana City and Matanzas Provinces, Cuba (10/66 population-based study). *MEDICC Rev* 2010 Jul;12(3):20-6.
- (162) Green AR. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. *Br J Pharmacol* 2008 Mar;153 Suppl 1:S325-S338.
- (163) Fisher M. The ischemic penumbra: identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis* 2004;17 Suppl 1:1-6.
- (164) Kaushal V, Schlichter LC. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci* 2008 Feb 27;28(9):2221-30.
- (165) Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, Challenges and Opportunities in Stroke. *Nature Reviews Neuroscience* 2003;4:399-415.
- (166) Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for Ischemic Stroke: Two Decades of Success and Failure. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004;1:36-45.
- (167) Castillo J, Rodríguez I. Biochemical Changes and Inflammatory Response as Markers for Brain Ischaemia: Molecular Markers of Diagnostic Utility and Prognosis in Human Clinical Practice. *Cerebrovascular Diseases* 2004;17(suppl 1):7-18.
- (168) Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005 Aug 15;39(4):429-43.

- (169) Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 2005 Jun 1;38(11):1433-44.
- (170) Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F, et al. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2005;31(1-3):105-16.
- (171) Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004 Aug;207(Pt 18):3221-31.
- (172) Cavallucci V, D'Amelio M. Matter of life and death: the pharmacological approaches targeting apoptosis in brain diseases. *Curr Pharm Des* 2011;17(3):215-29.
- (173) Cho S, Liu D, Gonzales C, Zaleska MM, Wood A. Temporal assessment of caspase activation in experimental models of focal and global ischemia. *Brain Research* 2003;982:146-55.
- (174) Walton M, Sirimanne E, Reutelingsperger C, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. Annexin V labels apoptotic neurons following hypoxia-ischemia. *Neuroreport* 1997 Dec 22;8(18):3871-5.
- (175) Siegel C, McCullough LD. NAD⁺ depletion or PAR polymer formation: which plays the role of executioner in ischaemic cell death? *Acta Physiol (Oxf)* 2010 Nov 20.
- (176) Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 2005 Jun;50(4):407-16.
- (177) Zhao Y, Rempe DA. Targeting astrocytes for stroke therapy. *Neurotherapeutics* 2010 Oct;7(4):439-51.
- (178) Al-Bahrani A, Taha S, Shaath H, Bakhiet M. TNF-alpha and IL-8 in acute stroke and the modulation of these cytokines by antiplatelet agents. *Curr Neurovasc Res* 2007 Feb;4(1):31-7.
- (179) Gasche Y, Soccac PM, Kanemitsu M, Copin JC. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* 2006 May 1;11:1289-301.:1289-301.
- (180) Green AR, Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today* 2006 Aug;11(15-16):681-93.
- (181) Suzuki Y. Role of tissue-type plasminogen activator in ischemic stroke. *J Pharmacol Sci* 2010;113(3):203-7.
- (182) Martinez-Sanchez P, Diez-Tejedor E, Fuentes B, Ortega-Casarrubios MA, Hacke W. Systemic reperfusion therapy in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007;24 Suppl 1:143-52.
- (183) Paciaroni M, Medeiros E, Bogousslavsky J. Desmoteplase. *Expert Opin Biol Ther* 2009 Jun;9(6):773-8.
- (184) Castillo J, Martí-Vilalta JL, Martínez-Vila E, Matías-Guiu J. Manual de enfermedades vasculares cerebrales. 2 ed. Barcelona, España: 1999.
- (185) Erecinska M, Silver IA. Calcium handling by hippocampal neurons under physiologic and pathologic conditions. *Adv Neurol* 1996;71:119-36.

- (186) Horn J, de Haan RJ, Vermeulen M, Luiten PG, Limburg M. Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review. *Stroke* 2001 Oct;32(10):2433-8.
- (187) Horn J, Limburg M. Calcium antagonists for acute ischemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD001928.
- (188) Camacho A, Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 2006 Jan;37(1):11-8.
- (189) Simon R, Shiraishi K. N-methyl-D-aspartate antagonist reduces stroke size and regional glucose metabolism. *Ann Neurol* 1990 Jun;27(6):606-11.
- (190) Ginsberg MD. Neuroprotection in brain ischemia_ an update_ Parts I and II. *Neuroscientist* 1995;95(103):164-75.
- (191) Reggiani A, Pietra C, Arban R, Marzola P, Guerrini U, Ziviani L, et al. The neuroprotective activity of the glycine receptor antagonist GV150526: an in vivo study by magnetic resonance imaging. *Eur J Pharmacol* 2001 May 11;419(2-3):147-53.
- (192) Takahashi M, Kohara A, Shishikura J, Kawasaki-Yatsugi S, Ni JW, Yatsugi S, et al. YM872: a selective, potent and highly water-soluble alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor antagonist. *CNS Drug Rev* 2002;8(4):337-52.
- (193) Olney JW. Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: an overview. *Psychopharmacol Bull* 1994;30(4):533-40.
- (194) Albers GW, Atkinson RP, Kelley RE, Rosenbaum DM. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the N-methyl-D-aspartate antagonist dextrorphan in patients with acute stroke. *Dextrorphan Study Group. Stroke* 1995 Feb;26(2):254-8.
- (195) Albers GW, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM. Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001 Dec 5;286(21):2673-82.
- (196) Elting JW, Sulter GA, Kaste M, Lees KR, Diener HC, Hommel M, et al. AMPA antagonist ZK200775 in patients with acute ischemic stroke: possible glial cell toxicity detected by monitoring of S-100B serum levels. *Stroke* 2002 Dec;33(12):2813-8.
- (197) Warach S, Kaufman D, Chiu D, Devlin T, Luby M, Rashid A, et al. Effect of the Glycine Antagonist Gavestinel on cerebral infarcts in acute stroke patients, a randomized placebo-controlled trial: The GAIN MRI Substudy. *Cerebrovasc Dis* 2006;21(1-2):106-11.
- (198) Wilby MJ, Hutchinson PJ. The pharmacology of chlormethiazole: a potential neuroprotective agent? *CNS Drug Rev* 2004;10(4):281-94.
- (199) Sydserff SG, Cross AJ, Green AR. The neuroprotective effect of chlormethiazole on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery ischaemia in the rat. *Neurodegeneration* 1995 Sep;4(3):323-8.
- (200) Lyden P, Shuaib A, Ng K, Levin K, Atkinson RP, Rajput A, et al. Clomethiazole Acute Stroke Study in ischemic stroke (CLASS-I): final results. *Stroke* 2002 Jan;33(1):122-8.
- (201) Ovbiagele B, Kidwell CS, Starkman S, Saver JL. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003 Jan;3(1):9-20.

- (202) Muir KW, Lees KR, Ford I, Davis S. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 2004 Feb 7;363(9407):439-45.
- (203) Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 2009 Jun;40(6):2244-50.
- (204) van der Worp HB, Kappelle LJ, Algra A, Bar PR, Orgogozo JM, Ringelstein EB, et al. The effect of tirilazad mesylate on infarct volume of patients with acute ischemic stroke. *Neurology* 2002 Jan 8;58(1):133-5.
- (205) Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T, et al. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc Dis* 1999 Mar;9(2):112-8.
- (206) Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 2003;15(3):222-9.
- (207) Weiss GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci* 1995;56(9):637-60.
- (208) Secades JJ, Frontera G. CDP-choline: pharmacological and clinical review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995 Oct;17 Suppl B:1-54.
- (209) Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Citicoline for treatment of experimental focal ischemia: histologic and behavioral outcome. *Neurol Res* 1996 Dec;18(6):570-4.
- (210) Hurtado O, Cardenas A, Pradillo JM, Morales JR, Ortego F, Sobrino T, et al. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 2007 Apr;26(1):105-11.
- (211) Hurtado O, Lizasoain I, Moro MA. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke* 2011 Jan;42(1 Suppl):S33-S35.
- (212) Rodriguez CY, Mengana TY, Munoz CA, Subiros MN, Gonzalez-Quevedo A, Sosa T, I, et al. Treatment with nasal neuro-EPO improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia. *ScientificWorldJournal* 2010;10:2288-300.
- (213) Garrido-Suarez BB, Garrido G, Delgado R, Bosch F, del CR. A *Mangifera indica* L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin. *Molecules* 2010;15(12):9035-45.
- (214) Penton-Rol G, Marin-Prida J, Pardo-Andreu G, Martinez-Sanchez G, Acosta-Medina EF, Valdivia-Acosta A, et al. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Res Bull* 2011 Jun 6.
- (215) Russell WMS, Burch RL, Hume CW. The principles of humane experimental technique. Universities Federation for Animal Welfare; 1992.
- (216) Saxena S, Cabuy E, Caroni P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat Neurosci* 2009 May;12(5):627-36.

- (217) Tovar YRL, Santa-Cruz LD, Tapia R. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener* 2009;4:31.
- (218) Kalmar B, Greensmith L. Activation of the heat shock response in a primary cellular model of motoneuron neurodegeneration-evidence for neuroprotective and neurotoxic effects. *Cell Mol Biol Lett* 2009;14(2):319-35.
- (219) Cassina P, Peluffo H, Pehar M, Martinez-Palma L, Ressia A, Beckman JS, et al. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J Neurosci Res* 2002 Jan 1;67(1):21-9.
- (220) Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, et al. Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci* 1998 Feb 1;18(3):923-31.
- (221) Swarup V, Julien JP. ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011 Mar 30;35(2):363-9.
- (222) Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994 Jun 17;264(5166):1772-5.
- (223) Hayworth CR, Gonzalez-Lima F. Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6.SOD1(G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* 2009 Dec 15;164(3):975-85.
- (224) Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 2008 May;85(1):94-134.
- (225) Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009 Jan;65 Suppl 1:S3-S9.
- (226) Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008 Jan;115(1):97-114.
- (227) Zhou H, Huang C, Chen H, Wang D, Landel CP, Xia PY, et al. Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genet* 2010 Mar;6(3):e1000887.
- (228) Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler JP, et al. Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotroph Lateral Scler* 2010;11(1-2):38-45.
- (229) Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 2010 Nov;92(3):386-404.
- (230) Slavin A, Kelly-Modis L, Labadia M, Ryan K, Brown ML. Pathogenic mechanisms and experimental models of multiple sclerosis. *Autoimmunity* 2010 Nov;43(7):504-13.
- (231) Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A. Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta* 2011 Feb;1812(2):177-83.

- (232) Emerson MR, Gallagher RJ, Marquis JG, LeVine SM. Enhancing the ability of experimental autoimmune encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of multiple sclerosis through refinement of the experimental design. *Comp Med* 2009 Apr;59(2):112-28.
- (233) Gold R, Lington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006 Aug;129(Pt 8):1953-71.
- (234) Kap YS, Laman JD, 't Hart BA. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset, a bridge between rodent EAE and multiple sclerosis for immunotherapy development. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010 Jun;5(2):220-30.
- (235) Mendel I, Kerlero de RN, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 1995 Jul;25(7):1951-9.
- (236) Rich C, Link JM, Zamora A, Jacobsen H, Meza-Romero R, Offner H, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 peptide induces severe chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR2-transgenic mice. *Eur J Immunol* 2004 May;34(5):1251-61.
- (237) Kurschus FC, Oelert T, Liliensiek B, Buchmann P, Wraith DC, Hammerling GJ, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice expressing the autoantigen MBP 1-10 covalently bound to the MHC class II molecule I-Au. *Int Immunol* 2006 Jan;18(1):151-62.
- (238) Tsunoda I, Kuang LQ, Theil DJ, Fujinami RS. Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2s mouse strains. *Brain Pathol* 2000 Jul;10(3):402-18.
- (239) Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, et al. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 1998 Oct;8(4):681-94.
- (240) Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fugger L. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 2006 Aug;129(Pt 8):1940-52.
- (241) Durukan A, Strbian D, Tatlisumak T. Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharm Des* 2008;14(4):359-70.
- (242) Hossmann K. Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovascular Research* 1998;39:106-20.
- (243) Castro-Pacheco A, Foyo-Niembro E, Perez-Perez V, Garcia-Hernandez J, Grijalva I. [Carotid-basilar artery communication in gerbils (*Meriones unguiculatus*)]. *Rev Neurol* 2001 Feb 1;32(3):225-8.
- (244) Levine S, Payan H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* 1966 Nov;16(3):255-62.
- (245) Gao Y, Mengana Y, Cruz YR, Munoz A, Teste IS, Garcia JD, et al. Different expression patterns of Ng2 and EPOR in the cerebral cortex and hippocampus revealed distinctive therapeutic effects of intranasal delivery of Neuro-EPO for ischemic insults to the gerbil brain. *J Histochem Cytochem* 2011 Feb;59(2):214-27.

- (246) Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 1994 Sep;25(9):1862-9.
- (247) Plahta WC, Clark DL, Colbourne F. 17beta-estradiol pretreatment reduces CA1 sector cell death and the spontaneous hyperthermia that follows forebrain ischemia in the gerbil. *Neuroscience* 2004;129(1):187-93.
- (248) Payan HM, Conrad JR. Carotid ligation in gerbils. Influence of age, sex, and gonads. *Stroke* 1977 Mar;8(2):194-6.
- (249) Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982 May 6;239(1):57-69.
- (250) Merchenthaler I, Dellovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 2003 Dec;1007:89-100.
- (251) Henderson CE, Bloch-Gallego E, Camu W. Purified embryonic motoneurons. In: Cohen J., Wilkin J.P., editors. *Neural cell culture: a practical approach*. New York: Oxford University Press Inc.; 1995. p. 69-81.
- (252) Mettling C, Gouin A, Robinson M, el MH, Camu W, Bloch-Gallego E, et al. Survival of newly postmitotic motoneurons is transiently independent of exogenous trophic support. *J Neurosci* 1995 Apr;15(4):3128-37.
- (253) Camu W, Henderson CE. Rapid purification of embryonic rat motoneurons: an in vitro model for studying MND/ALS pathogenesis. *J Neurol Sci* 1994 Jul;124 Suppl:73-4.
- (254) Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 1977 Apr;30(4):275-82.
- (255) Bratthauer GL. *The Avidin-Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin-Biotin Binding Methods. Immunocytochemical Methods and Protocols*. 115 ed. 1999. p. 203-14.
- (256) ImageJ [computer program]. Version 1.34s. National Institutes of Health,USA: 2006.
- (257) Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, Muraca G, Mareschi K, Rustichelli D, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2008 Sep;31(3):395-405.
- (258) Ingham DJ, Beer S, Money S, Hansen G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques* 2001 Jul;31(1):132-40.
- (259) Neymotin A, Petri S, Calingasan NY, Wille E, Schafer P, Stewart C, et al. Lenalidomide (Revlimid) administration at symptom onset is neuroprotective in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2009 Nov;220(1):191-7.
- (260) 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.
- (261) Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973 May;21(2):205-35.

- (262) Tesseur I, Van DJ, Bruynseels K, Bronfman F, Sciote 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.
- (263) Crow JP, Calingasan NY, Chen J, Hill JL, Beal MF. Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice. *Ann Neurol* 2005 Aug;58(2):258-65.
- (264) 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.
- (265) Kloskowska E, Pham TM, Nilsson T, Zhu S, Oberg J, Codita A, et al. Cognitive impairment in the Tg6590 transgenic rat model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2010 Jun;14(6B):1816-23.
- (266) Dhib-Jalbut S, Arnold DL, Cleveland DW, Fisher M, Friedlander RM, Mouradian MM, et al. Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 2006 Jul;176(1-2):198-215.
- (267) Harguindey S, Orive G, Cacabelos R, Hevia EM, de Otazu RD, Arranz JL, et al. An integral approach to the etiopathogenesis of human neurodegenerative diseases (HNDDs) and cancer. Possible therapeutic consequences within the frame of the trophic factor withdrawal syndrome (TFWS). *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008 Dec;4(6):1073-84.
- (268) Perrelet D, Ferri A, Liston P, Muzzin P, Korneluk RG, Kato AC. IAPs are essential for GDNF-mediated neuroprotective effects in injured motor neurons in vivo. *Nat Cell Biol* 2002 Feb;4(2):175-9.
- (269) Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 1994 Nov 11;266(5187):1062-4.
- (270) Gandelman M, Peluffo H, Beckman JS, Cassina P, Barbeito L. Extracellular ATP and the P2X7 receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 2010;7:33.
- (271) Tsai NP, Tsui YC, Pintar JE, Loh HH, Wei LN. Kappa opioid receptor contributes to EGF-stimulated neurite extension in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Feb 16;107(7):3216-21.
- (272) Oppenheim RW, Prevette D, Haverkamp LJ, Houenou L, Yin QW, McManaman J. Biological studies of a putative avian muscle-derived neurotrophic factor that prevents naturally occurring motoneuron death in vivo. *J Neurobiol* 1993 Aug;24(8):1065-79.
- (273) Boillee S, Cadusseau J, Couplier M, Grannec G, Junier MP. Transforming growth factor alpha: a promoter of motoneuron survival of potential biological relevance. *J Neurosci* 2001 Sep 15;21(18):7079-88.
- (274) Huh JY, Jeon SH, Kim SH. The CNS midline cells and Egfr signaling genes are required for establishment of the RP2 motoneuron lineage in the *Drosophila* central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Mar 20;380(4):729-35.
- (275) Lee DC, Rochford R, Todaro GJ, Villarreal LP. Developmental expression of rat transforming growth factor-alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 1985 Dec;5(12):3644-6.

- (276) Lazar LM, Blum M. Regional distribution and developmental expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α mRNA in mouse brain by a quantitative nuclease protection assay. *J Neurosci* 1992 May;12(5):1688-97.
- (277) Brachmann R, Lindquist PB, Nagashima M, Kohr W, Lipari T, Napier M, et al. Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF- α receptors. *Cell* 1989 Feb 24;56(4):691-700.
- (278) Decker SJ. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α induce differential processing of the epidermal growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Jan 30;166(2):615-21.
- (279) Krohn AJ, Preis E, Prehn JH. Staurosporine-Induced Apoptosis of Cultured Rat Hippocampal Neurons Involves Caspase-1-Like Proteases as Upstream Initiators and Increased Production of Superoxide as a Main Downstream Effector. *J Neurosci* 1998 Oct 15;18(20):8186-97.
- (280) Koh JY, Wie MB, Gwag BJ, Sensi SL, Canzoniero LM, Demaro J, et al. Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp Neurol* 1995 Oct;135(2):153-9.
- (281) Lee J, Lim E, Kim Y, Li E, Park S. Ghrelin attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *J Endocrinol* 2010 Jun;205(3):263-70.
- (282) Frago LM, Canon S, de la Rosa EJ, Leon Y, Varela-Nieto I. Programmed cell death in the developing inner ear is balanced by nerve growth factor and insulin-like growth factor I. *J Cell Sci* 2003 Feb 1;116(Pt 3):475-86.
- (283) Zheng WH, Kar S, Dore S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *J Neural Transm Suppl* 2000;(60):261-72.
- (284) Freude S, Leeser U, Muller M, Hettich MM, Udelhoven M, Schilbach K, et al. IRS-2 branch of IGF-1 receptor signaling is essential for appropriate timing of myelination. *J Neurochem* 2008 Nov;107(4):907-17.
- (285) Bilak MM, Corse AM, Kuncl RW. Additivity and potentiation of IGF-I and GDNF in the complete rescue of postnatal motor neurons. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2001 Jun;2(2):83-91.
- (286) Pang Y, Zheng B, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z. IGF-1 protects oligodendrocyte progenitors against TNF α -induced damage by activation of PI3K/Akt and interruption of the mitochondrial apoptotic pathway. *Glia* 2007 Aug 15;55(11):1099-107.
- (287) Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 2005 Dec;26(7):916-43.
- (288) Liu B, Neufeld AH. Activation of epidermal growth factor receptors in astrocytes: from development to neural injury. *J Neurosci Res* 2007 Dec;85(16):3523-9.
- (289) Wagner B, Natarajan A, Grunau S, Kroismayr R, Wagner EF, Sibilina M. Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J* 2006 Feb 22;25(4):752-62.
- (290) Sun Y, Goderie SK, Temple S. Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* 2005 Mar 24;45(6):873-86.

- (291) Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 2003 Jun;27(3):277-324.
- (292) Albrecht PJ, Dahl JP, Stoltzfus OK, Levenson R, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Exp Neurol* 2002 Jan;173(1):46-62.
- (293) Vargas MR, Johnson DA, Sirkis DW, Messing A, Johnson JA. Nrf2 activation in astrocytes protects against neurodegeneration in mouse models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2008 Dec 10;28(50):13574-81.
- (294) Staats KA, Van Den BL. Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival. *J Biol Phys* 2009 Oct;35(4):337-46.
- (295) Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, et al. Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2002 Jan;80(1):158-67.
- (296) Kiaei M, Petri S, Kipiani K, Gardian G, Choi DK, Chen J, et al. Thalidomide and lenalidomide extend survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2006 Mar 1;26(9):2467-73.
- (297) Hensley K, Mhatre M, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, et al. On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2006 Nov;8(11-12):2075-87.
- (298) Madathil SK, Evans HN, Saatman KE. Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2010 Jan;27(1):95-107.
- (299) 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.
- (300) Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009 Dec;4(4):389-98.
- (301) Tolosa L, Caraballo-Miralles V, Olmos G, Llado J. TNF-alpha potentiates glutamate-induced spinal cord motoneuron death via NF-kappaB. *Mol Cell Neurosci* 2011 Jan;46(1):176-86.
- (302) Dodge JC, Haidet AM, Yang W, Passini MA, Hester M, Clarke J, et al. Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther* 2008 Jun;16(6):1056-64.
- (303) Lange U, Teichmann J, Stracke H. Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis. *Eur J Med Res* 2000 Dec 29;5(12):507-11.
- (304) 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.
- (305) Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 2002 Mar 15;22(6):RC215.

- (306) Das A, Smith JA, Gibson C, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF-alpha-induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *J Endocrinol* 2011 Feb;208(2):171-82.
- (307) Borges MH, DiNinno FB, Lengyel AM. Different effects of growth hormone releasing peptide (GHRP-6) and GH-releasing hormone on GH release in endogenous and exogenous hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997 Jun;46(6):713-8.
- (308) Ghoddoussi F, Galloway MP, Jambekar A, Bame M, Needleman R, Brusilow WS. Methionine sulfoximine, an inhibitor of glutamine synthetase, lowers brain glutamine and glutamate in a mouse model of ALS. *J Neurol Sci* 2010 Mar 15;290(1-2):41-7.
- (309) Smith S, Francis R, Guilbert L, Baker PN. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. *Placenta* 2002 Apr;23(4):322-30.
- (310) Heidinger V, Hicks D, Sahel J, Dreyfus H. Peptide growth factors but not ganglioside protect against excitotoxicity in rat retinal neurons in vitro. *Brain Res* 1997 Sep 5;767(2):279-88.
- (311) 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.
- (312) Suzuki K, Ikegaya Y, Matsuura S, Kanai Y, Endou H, Matsuki N. Transient upregulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in cultured astrocytes. *Journal of Cell Science* 2001 Oct 15;114(20):3717-25.
- (313) Kawahara Y, Kwak S. Excitotoxicity and ALS: what is unique about the AMPA receptors expressed on spinal motor neurons? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2005 Sep;6(3):131-44.
- (314) Kosuge Y, Sekikawa-Nishida K, Negi H, Ishige K, Ito Y. Characterization of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity in organotypic spinal cord culture prepared from ALS model mice. *Neurosci Lett* 2009 Apr 24;454(2):165-9.
- (315) Tshala-Katumbay D, Monterroso V, Kayton R, Lasarev M, Sabri M, Spencer P. Probing mechanisms of axonopathy. Part I: Protein targets of 1,2-diacetylbenzene, the neurotoxic metabolite of aromatic solvent 1,2-diethylbenzene. *Toxicol Sci* 2008 Sep;105(1):134-41.
- (316) Kim MS, Hashemi SB, Spencer PS, Sabri MI. Amino acid and protein targets of 1,2-diacetylbenzene, a potent aromatic gamma-diketone that induces proximal neurofilamentous axonopathy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002 Aug 15;183(1):55-65.
- (317) Holzbaur EL. Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol* 2004 May;14(5):233-40.
- (318) Delisle MB, Carpenter S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1984 Feb;63(2):241-50.
- (319) Okamoto K, Hirai S, Shoji M, Senoh Y, Yamazaki T. Axonal swellings in the corticospinal tracts in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1990;80(2):222-6.
- (320) Niebroj-Dobosz I, Rafalowska J, Fidzianska A, Gadamski R, Grieb P. Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. *Folia Neuropathol* 2007;45(4):236-41.

- (321) de CM, Scotto M, Lopes A, Swash M. Clinical and neurophysiological evaluation of progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2003 Nov;28(5):630-3.
- (322) de CM, Swash M. Nerve conduction studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2000 Mar;23(3):344-52.
- (323) 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.
- (324) 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.
- (325) Julien JP, Kriz J. Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2006 Nov;1762(11-12):1013-24.
- (326) Strong MJ. The basic aspects of therapeutics in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol Ther* 2003 Jun;98(3):379-414.
- (327) Motil J, Dubey M, Chan WK, Shea TB. Inhibition of dynein but not kinesin induces aberrant focal accumulation of neurofilaments within axonal neurites. *Brain Res* 2007 Aug 20;1164:125-31.
- (328) Harms C, Bosel J, Lautenschlager M, Harms U, Braun JS, Hortnagl H, et al. Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol Cell Neurosci* 2004 Jan;25(1):69-82.
- (329) Lipton SA. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. *Curr Drug Targets* 2007 May;8(5):621-32.
- (330) Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2008 Jun;30(3):400-7.
- (331) Atkin JD, Farg MA, Turner BJ, Tomas D, Lysaght JA, et al. Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 2006 Oct 6;281(40):30152-65.
- (332) Yang YS, Harel NY, Strittmatter SM. Reticulon-4A (Nogo-A) redistributes protein disulfide isomerase to protect mice from SOD1-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 2009 Nov 4;29(44):13850-9.
- (333) Kim MS, Kim MK, Kim KS, Chung JH, Kim SJ, Kim JH, et al. Cytotoxicity of 1,2-diacetylbenzene in human neuroblastoma SHSY5Y cells is mediated by oxidative stress. *Toxicology* 2008 Jan 14;243(1-2):216-23.
- (334) Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 2009 Dec 4.
- (335) Sasaki S, Iwata M. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1996 Feb 2;204(1-2):53-6.
- (336) Siklos L, Engelhardt J, Harati Y, Smith RG, Joo F, Appel SH. Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996 Feb;39(2):203-16.

- (337) Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y. Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009 Apr;68(4):365-73.
- (338) Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, et al. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 2002 Aug 16;277(33):29626-33.
- (339) Wood-Allum CA, Barber SC, Kirby J, Heath P, Holden H, Mead R, et al. Impairment of mitochondrial anti-oxidant defence in SOD1-related motor neuron injury and amelioration by ebosen. *Brain* 2006 Jul;129(Pt 7):1693-709.
- (340) Martin LJ, Gertz B, Pan Y, Price AC, Molkentin JD, Chang Q. The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: involvement in the pathobiology of ALS mice. *Exp Neurol* 2009 Aug;218(2):333-46.
- (341) Tshala-Katumbay DD, Palmer VS, Lasarev MR, Kayton RJ, Sabri MI, Spencer PS. Monocyclic and dicyclic hydrocarbons: structural requirements for proximal giant axonopathy. *Acta Neuropathol* 2006 Sep;112(3):317-24.
- (342) Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Hengerer B, Loffler JP, Martin J, et al. Guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacological active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop. *Amyotroph Lateral Scler* 2007 Aug;8(4):217-23.
- (343) Rothstein JD. Of mice and men: reconciling preclinical ALS mouse studies and human clinical trials. *Ann Neurol* 2003 Apr;53(4):423-6.
- (344) London Z, Albers JW. Toxic neuropathies associated with pharmaceutical and industrial agents. *Neurol Clin* 2007 Feb;25(1):257-76.
- (345) 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.
- (346) Finkel DM, Capmourteres EM. Combination of nondepolarizing muscle relaxants: synergism of potentiation. *Rev argent anesthesiol* 1999;57(3):145-54.
- (347) Dreyfus H, Sahel J, Heindinger V, Mohand-Said S, Guerold B, Meuillet E, et al. Gangliosides and neurotrophic growth factors in the retina. Molecular interactions and applications as neuroprotective agents. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Jun 19;845:240-52.
- (348) 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.
- (349) 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.
- (350) Paneda C, Arroba AI, Frago LM, Holm AM, Romer J, Argente J, et al. Growth hormone-releasing peptide-6 inhibits cerebellar cell death in aged rats. *Neuroreport* 2003 Aug 26;14(12):1633-5.
- (351) Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003 Aug 8;301(5634):839-42.

- (352) 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.
- (353) Lai EC, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinas DF, Kratz R, et al. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology* 1997 Dec;49(6):1621-30.
- (354) Gago N, vellana-Adalid V, Evercooren AB, Schumacher M. Control of cell survival and proliferation of postnatal PSA-NCAM(+) progenitors. *Mol Cell Neurosci* 2003 Feb;22(2):162-78.
- (355) 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.
- (356) 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.
- (357) 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.
- (358) Platten M, Ho PP, Youssef S, Fontoura P, Garren H, Hur EM, et al. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 2005 Nov 4;310(5749):850-5.
- (359) Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
- (360) Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Lington C, Duncan ID. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol* 2002 Feb;51(2):215-23.
- (361) Delarasse C, Daubas P, Mars LT, Vizler C, Litzenburger T, Iglesias A, et al. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J Clin Invest* 2003 Aug;112(4):544-53.
- (362) Wang H, Marnett LJ, Harris TM, Rizzo CJ. A novel synthesis of malondialdehyde adducts of deoxyguanosine, deoxyadenosine, and deoxycytidine. *Chem Res Toxicol* 2004 Feb;17(2):144-9.
- (363) Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchell D, Wedemeyer J, Madanat R, et al. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Feb 18;100(4):1867-72.
- (364) Zargari M, Allameh A, Sanati MH, Tiraihi T, Lavasani S, Emadyan O. Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. *Neurosci Lett* 2007 Jan 22;412(1):24-8.
- (365) Wallberg M, Bergquist J, Achour A, Breij E, Harris RA. Malondialdehyde modification of myelin oligodendrocyte glycoprotein leads to increased immunogenicity and encephalitogenicity. *Eur J Immunol* 2007 Jul;37(7):1986-95.
- (366) Bizzozero OA, Reyes S, Ziegler J, Smerjac S. Lipid peroxidation scavengers prevent the carbonylation of cytoskeletal brain proteins induced by glutathione depletion. *Neurochem Res* 2007 Dec;32(12):2114-22.

- (367) Wilczak N, Ramsaransing GS, Mostert J, Chesik D, De KJ. Serum levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 in relapsing and primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005 Feb;11(1):13-5.
- (368) Li W, Quigley L, Yao DL, Hudson LD, Brenner M, Zhang BJ, et al. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: effects of insulin-like growth factor-I treatment on clinical deficits, lesion severity, glial responses, and blood brain barrier defects. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998 May;57(5):426-38.
- (369) Bibollet-Bahena O, Almazan G. IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. *J Neurochem* 2009 Jun;109(5):1440-51.
- (370) Kooijman R, Sarre S, Michotte Y, De KJ. Insulin-like growth factor I: a potential neuroprotective compound for the treatment of acute ischemic stroke? *Stroke* 2009 Apr;40(4):e83-e88.
- (371) Vincent AM, Mobley BC, Hiller A, Feldman EL. IGF-I prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death. *Neurobiol Dis* 2004 Jul;16(2):407-16.
- (372) Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, et al. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem* 1999 Nov;73(5):2037-46.
- (373) Giuliani C, Saji M, Bucci I, Fiore G, Liberatore M, Singer DS, et al. Transcriptional regulation of major histocompatibility complex class I gene by insulin and IGF-I in FRTL-5 thyroid cells. *J Endocrinol* 2006 Jun;189(3):605-15.
- (374) Ito T, Ito N, Bettermann A, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am J Pathol* 2004 Feb;164(2):623-34.
- (375) Hoftberger R, Boul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 2004 Jan;14(1):43-50.
- (376) Guan J. Insulin-Like Growth Factor -1 (IGF-1) Derived Neuropeptides, a Novel Strategy for the Development of Pharmaceuticals for Managing Ischemic Brain Injury. *CNS Neurosci Ther* 2010 Mar 4.
- (377) Poljakovic Z, Zurak N, Brinar V, Korsic M, Basic S, Hajsek S. Growth hormone and insulin growth factor-I levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2006 Mar;108(3):255-8.
- (378) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 Dec 9;402(6762):656-60.
- (379) Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *J Immunol* 2009 Aug 15;183(4):2859-66.
- (380) Sulkowski G, browska-Bouta B, Kwiatkowska-Patzer B, Struzynska L. Alterations in glutamate transport and group I metabotropic glutamate receptors in the rat brain during acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathol* 2009;47(4):329-37.

- (381) Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol* 2003 May;53(5):588-95.
- (382) Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 2002 May 3;90(8):844-9.
- (383) Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC. Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 2002 Nov;40(2):195-205.
- (384) Pan W, Kastin AJ. Entry of EGF into brain is rapid and saturable. *Peptides* 1999;20(9):1091-8.
- (385) Plata-Salaman CR. Epidermal growth factor and the nervous system. *Peptides* 1991 May;12(3):653-63.
- (386) Scalabrino G, Galimberti D, Mutti E, Scalabrini D, Veber D, De RM, et al. Loss of epidermal growth factor regulation by cobalamin in multiple sclerosis. *Brain Res* 2010 May 28;1333:64-71.
- (387) Tureyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery* 2005 Dec;57(6):1254-63.
- (388) Raineteau O, Rietschin L, Gradwohl G, Guillemot F, Gahwiler BH. Neurogenesis in hippocampal slice cultures. *Mol Cell Neurosci* 2004 Jun;26(2):241-50.
- (389) Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K. Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett* 2006 Jul 31;403(1-2):63-7.
- (390) Knapp PE, Adams MH. Epidermal growth factor promotes oligodendrocyte process formation and regrowth after injury. *Exp Cell Res* 2004 Jun 10;296(2):135-44.
- (391) Wong RW, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004 Apr;15(2-3):147-56.
- (392) Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *J Clin Invest* 2003 Apr;111(8):1125-32.
- (393) Mehler MF, Gokhan S. Postnatal cerebral cortical multipotent progenitors: regulatory mechanisms and potential role in the development of novel neural regenerative strategies. *Brain Pathol* 1999 Jul;9(3):515-26.
- (394) Deleyrolle L, Marchal-Victorion S, Dromard C, Fritz V, Saunier M, Sabourin JC, et al. Exogenous and fibroblast growth factor 2/epidermal growth factor-regulated endogenous cytokines regulate neural precursor cell growth and differentiation. *Stem Cells* 2006 Mar;24(3):748-62.
- (395) Mason JL, Ye P, Suzuki K, D'Ercole AJ, Matsushima GK. Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci* 2000 Aug 1;20(15):5703-8.
- (396) Wilson HC, Onischke C, Raine CS. Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors. *Glia* 2003 Nov;44(2):153-65.

- (397) Limesand KH, Barzen KA, Quissell DO, Anderson SM. Synergistic suppression of apoptosis in salivary acinar cells by IGF1 and EGF. *Cell Death Differ* 2003 Mar;10(3):345-55.
- (398) Butterfield JD, McGraw CP. Effect of DPPD (diphenyl-para-phenylenediamine) on stroke and cerebral edema in gerbils. *Stroke* 1978 Sep;9(5):480-3.
- (399) Lawner P, Laurent J, Simeone F, Fink E, Rubin E. Attenuation of ischemic brain edema by pentobarbital after carotid ligation in the gerbil. *Stroke* 1979 Nov;10(6):644-7.
- (400) Seal JB, Buchh BN, Marks JD. New variability in cerebrovascular anatomy determines severity of hippocampal injury following forebrain ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain Res* 2006 Feb 16;1073-1074:451-9.
- (401) Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004 Apr;13(1):11-7.
- (402) Zablocka B, Maternicka K, Zalewska T, Domanska-Janik K. Expression of Ca²⁺-dependent (classical) PKC mRNA isoforms after transient cerebral ischemia in gerbil hippocampus. *Brain Res* 1998 Jan 1;779(1-2):254-8.
- (403) Clark DL, DeBow SB, Iseke MD, Colbourne F. Stress-induced fever after postischemic rectal temperature measurements in the gerbil. *Can J Physiol Pharmacol* 2003 Sep;81(9):880-3.
- (404) Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000 Aug 11;401(3):349-56.
- (405) Laidley DT, Colbourne F, Corbett D. Increased behavioral and histological variability arising from changes in cerebrovascular anatomy of the Mongolian gerbil. *Curr Neurovasc Res* 2005 Dec;2(5):401-7.
- (406) Stummer W, Baethmann A, Murr R, Schürer L, Kempfski OS. Cerebral Protection Against Ischemia by Locomotor Activity in Gerbils. Underlying Mechanisms. *Stroke* 1995;26:1423-30.
- (407) Solling C, Christensen AT, Nygaard U, Krag S, Frokiaer J, Wogensen L, et al. Erythropoietin does not attenuate renal dysfunction or inflammation in a porcine model of endotoxemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2011 Apr;55(4):411-21.
- (408) Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999 Dec;30(12):2752-8.
- (409) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995 Dec 14;333(24):1581-7.
- (410) Radenovic L, Selakovic V, Janac B, Andjus PR. Neuroprotective efficiency of NMDA receptor blockade in the striatum and CA3 hippocampus after various durations of cerebral ischemia in gerbils. *Acta Physiol Hung* 2011 Mar;98(1):32-44.
- (411) Kim JM, Kim S, Kim DH, Lee CH, Park SJ, Jung JW, et al. Neuroprotective effect of forsythiaside against transient cerebral global ischemia in gerbil. *Eur J Pharmacol* 2011 Jun 25;660(2-3):326-33.

- (412) Lee H, Bae JH, Lee SR. Protective effect of green tea polyphenol EGCG against neuronal damage and brain edema after unilateral cerebral ischemia in gerbils. *J Neurosci Res* 2004 Sep 15;77(6):892-900.
- (413) Kirby BP, Shaw GG. The neuroprotective effects of N1-dansyl-spermine in the gerbil model of cerebral ischaemia. *Brain Res* 2004 Jun 11;1011(1):74-83.
- (414) Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx* 2004 Jan;1(1):5-16.
- (415) Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke* 2005 Feb;36(2):189-92.
- (416) Lo EH, Rosenberg GA. The neurovascular unit in health and disease: introduction. *Stroke* 2009 Mar;40(3 Suppl):S2-S3.
- (417) Guo S, Lo EH. Dysfunctional cell-cell signaling in the neurovascular unit as a paradigm for central nervous system disease. *Stroke* 2009 Mar;40(3 Suppl):S4-S7.
- (418) Planas AM, Justicia C, Soriano MA, Ferrer I. Epidermal growth factor receptor in proliferating reactive glia following transient focal ischemia in the rat brain. *Glia* 1998 Jun;23(2):120-9.
- (419) Simpson DL, Morrison R, de VJ, Herschman HR. Epidermal growth factor binding and mitogenic activity on purified populations of cells from the central nervous system. *J Neurosci Res* 1982;8(2-3):453-62.
- (420) Cheyuo C, Wu R, Zhou M, Jacob A, Coppa G, Wang P. Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. *Shock* 2011 Mar;35(3):258-65.
- (421) Yu J, Zeng J, Cheung RT, Xiong L, He M, Liang Z, et al. Intracerebroventricular injection of epidermal growth factor reduces neurological deficit and infarct volume and enhances nestin expression following focal cerebral infarction in adult hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009 May;36(5-6):539-46.
- (422) Brywe KG, Leverin AL, Gustavsson M, Mallard C, Granata R, Destefanis S, et al. Growth hormone-releasing peptide hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *Endocrinology* 2005 Nov;146(11):4665-72.
- (423) Dickson SL, Doutrelant-Viltart O, Dyball RE, Leng G. Retrogradely labelled neurosecretory neurones of the rat hypothalamic arcuate nucleus express Fos protein following systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J Endocrinol* 1996 Nov;151(2):323-31.
- (424) Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* 2002 Jan 15;62(2):488-96.
- (425) Sheng G, Guo J, Warner BW. Epidermal growth factor receptor signaling modulates apoptosis via p38alpha MAPK-dependent activation of Bax in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007 Sep;293(3):G599-G606.
- (426) Meixner A, Karreth F, Kenner L, Penninger JM, Wagner EF. Jun and JunD-dependent functions in cell proliferation and stress response. *Cell Death Differ* 2010 Sep;17(9):1409-19.

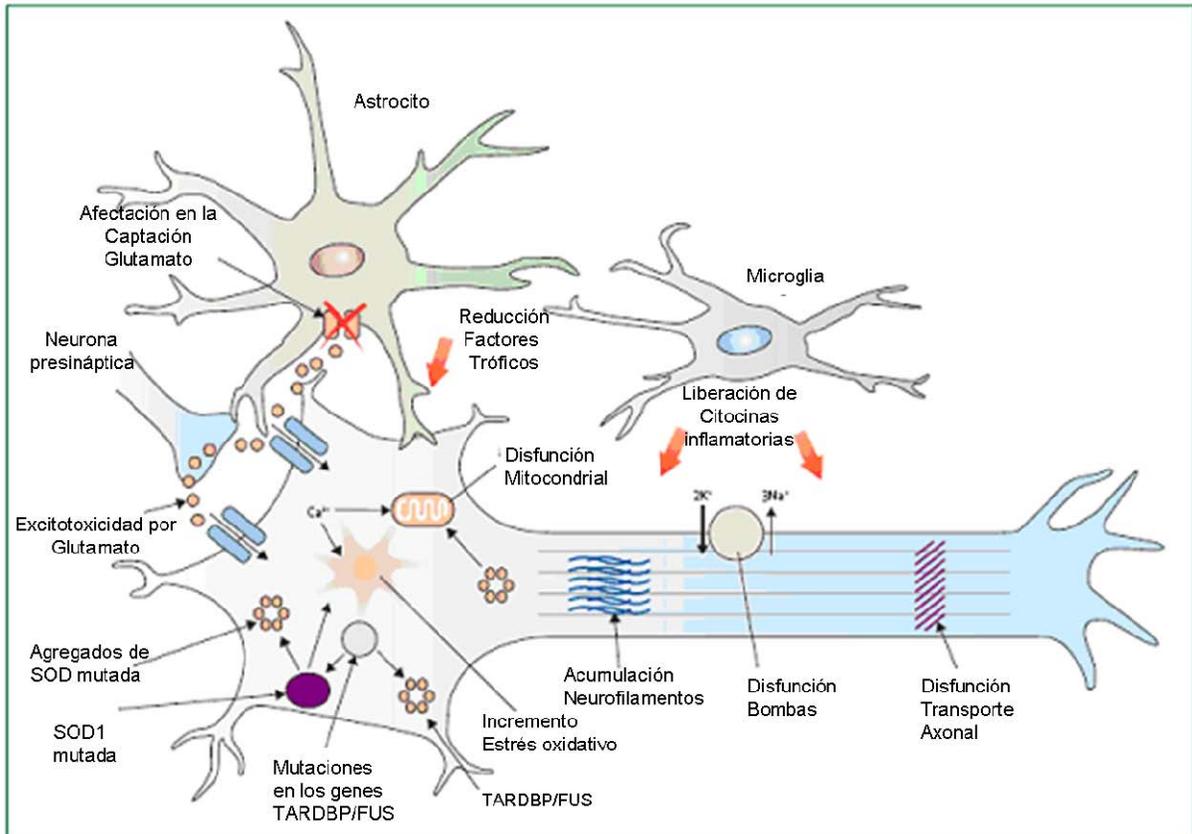
- (427) Kong M, Mounier C, Wu J, Posner BI. Epidermal growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation and DNA synthesis. Identification of Grb2-associated binder 2 as the major mediator in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 2000 Nov 17;275(46):36035-42.
- (428) Bandyopadhyay S, Chiang CY, Srivastava J, Gersten M, White S, Bell R, et al. A human MAP kinase interactome. *Nat Methods* 2010 Oct;7(10):801-5.
- (429) Greco T, Fiskum G. Neuroprotection through stimulation of mitochondrial antioxidant protein expression. *J Alzheimers Dis* 2010;20 Suppl 2:S427-S437.
- (430) Ge C, Yu M, Petite JN, Zhang C. Epidermal growth factor-induced proliferation of chicken primordial germ cells: involvement of calcium/protein kinase C and NFkB1. *Biol Reprod* 2009 Mar;80(3):528-36.
- (431) Gibson SB. Epidermal growth factor and trail interactions in epithelial-derived cells. *Vitam Horm* 2004;67:207-27.
- (432) Pitkanen A. Clinical trials in neuroprotection. 23-25 January 2003, Key Biscayne, FL, USA. *IDrugs* 2003 Mar;6(3):200-2.
- (433) Siffrin V, Vogt J, Radbruch H, Nitsch R, Zipp F. Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends Neurosci* 2010 Apr;33(4):202-10.
- (434) Fornai F, Meininger V, Silani V. Future therapeutical strategies dictated by pre-clinical evidence in ALS. *Arch Ital Biol* 2011 Mar;149(1):169-74.
- (435) Pasarica D, Gheorghiu M, Toparceanu F, Bleotu C, Ichim L, Trandafir T. Neurotrophin-3, TNF-alpha and IL-6 relations in serum and cerebrospinal fluid of ischemic stroke patients. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2005 Jan;64(1-4):27-33.
- (436) Poloni M, Facchetti D, Mai R, Micheli A, Agnoletti L, Francolini G, et al. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha and its soluble receptors are increased in the blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 2000 Jun 30;287(3):211-4.
- (437) Zaremba J, Losy J. [Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in patients with ischemic stroke]. *Neurol Neurochir Pol* 2001 Jan;35(1):41-6.
- (438) Zaremba J, Losy J. Early TNF-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol Scand* 2001 Nov;104(5):288-95.
- (439) Hoffmann M, Schmidt M, Wels W. Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Immunol Immunother* 1998 Nov;47(3):167-75.
- (440) Akca H, Akan SY, Yanikoglu A, Ozes ON. Suppression of TNF-alpha mediated apoptosis by EGF in TNF-alpha sensitive human cervical carcinoma cell line. *Growth Factors* 2003 Mar;21(1):31-9.
- (441) Scalabrino G. Cobalamin (vitamin B(12)) in subacute combined degeneration and beyond: traditional interpretations and novel theories. *Exp Neurol* 2005 Apr;192(2):463-79.
- (442) Mutti E, Magnaghi V, Veber D, Faroni A, Pece S, Di Fiore PP, et al. Cobalamin deficiency-induced changes of epidermal growth factor (EGF)-receptor expression and EGF levels in rat spinal cord. *Brain Res* 2011 Feb 28;1376:23-30.

- (443) Naylor M, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ, Vemuganti R. Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus. *Neurochem Int* 2005 Dec;47(8):565-72.
- (444) Diz CY, Spuch CC, Perez TD, Mallo FF. GH responses to GHRH and GHRP-6 in Streptozotocin (STZ)-diabetic rats. *Life Sci* 2003 Nov 14;73(26):3375-85.
- (445) Yao DL, Liu X, Hudson LD, Webster HD. Insulin-like growth factor-I given subcutaneously reduces clinical deficits, decreases lesion severity and upregulates synthesis of myelin proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Life Sci* 1996;58(16):1301-6.
- (446) Harvey S, Baudet ML, Sanders EJ. Growth hormone-induced neuroprotection in the neural retina during chick embryogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2009 Apr;1163:414-6.
- (447) Matsuzaki M, Izumi T, Shishikura K, Suzuki H, Hirayama Y. Hypothalamic growth hormone deficiency and supplementary GH therapy in two patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Neuropediatrics* 2002 Oct;33(5):271-3.
- (448) Matsuzaki M, Izumi T, Ebato K, Suzuki H, Shishikura K, Osawa M, et al. [Hypothalamic GH Deficiency and gelastic seizures in a 10-year-old girl with MELAS]. *No To Hattatsu* 1991 Jul;23(4):411-6.
- (449) Scheepens A, Sirimanne E, Beilharz E, Breier BH, Waters MJ, Gluckman PD, et al. Alterations in the neural growth hormone axis following hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1999 May 7;68(1-2):88-100.
- (450) Pathipati P, Surus A, Williams CE, Scheepens A. Delayed and chronic treatment with growth hormone after endothelin-induced stroke in the adult rat. *Behav Brain Res* 2009 Dec 1;204(1):93-101.
- (451) Christophidis LJ, Gorba T, Gustavsson M, Williams CE, Werther GA, Russo VC, et al. Growth hormone receptor immunoreactivity is increased in the subventricular zone of juvenile rat brain after focal ischemia: a potential role for growth hormone in injury-induced neurogenesis. *Growth Horm IGF Res* 2009 Dec;19(6):497-506.
- (452) Sanders EJ, Baudet ML, Parker E, Harvey S. Signaling mechanisms mediating local GH action in the neural retina of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 2009 Sep 1;163(1-2):63-9.
- (453) Davis DP, Patel PM. Ischemic preconditioning in the brain. *Curr Opin Anaesthesiol* 2003 Oct;16(5):447-52.
- (454) Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res* 2010 Apr;88(5):1017-25.
- (455) Ehrenreich H, Sirén A-L. Neuroprotection - what does it mean? - what means do we have? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2001;251:149-51.
- (456) Aberg D. Role of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in neurogenesis. *Endocr Dev* 2010;17:63-76.

- (457) Annenkov A. The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis. *Mol Neurobiol* 2009 Dec;40(3):195-215.
- (458) Kornblum HI, Zurcher SD, Werb Z, Derynck R, Seroogy KB. Multiple trophic actions of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in the central nervous system. *Eur J Neurosci* 1999 Sep;11(9):3236-46.
- (459) Liu B, Neufeld AH. Activation of epidermal growth factor receptors directs astrocytes to organize in a network surrounding axons in the developing rat optic nerve. *Dev Biol* 2004 Sep 15;273(2):297-307.
- (460) Brodie C, Kentroti S, Vernadakis A. Growth factors attenuate the cholinotoxic effects of ethanol during early neuroembryogenesis in the chick embryo. *Int J Dev Neurosci* 1991;9(3):203-13.
- (461) Frago LM, Chowen JA. Basic physiology of the growth hormone/insulin-like growth factor axis. *Adv Exp Med Biol* 2005;567:1-25.

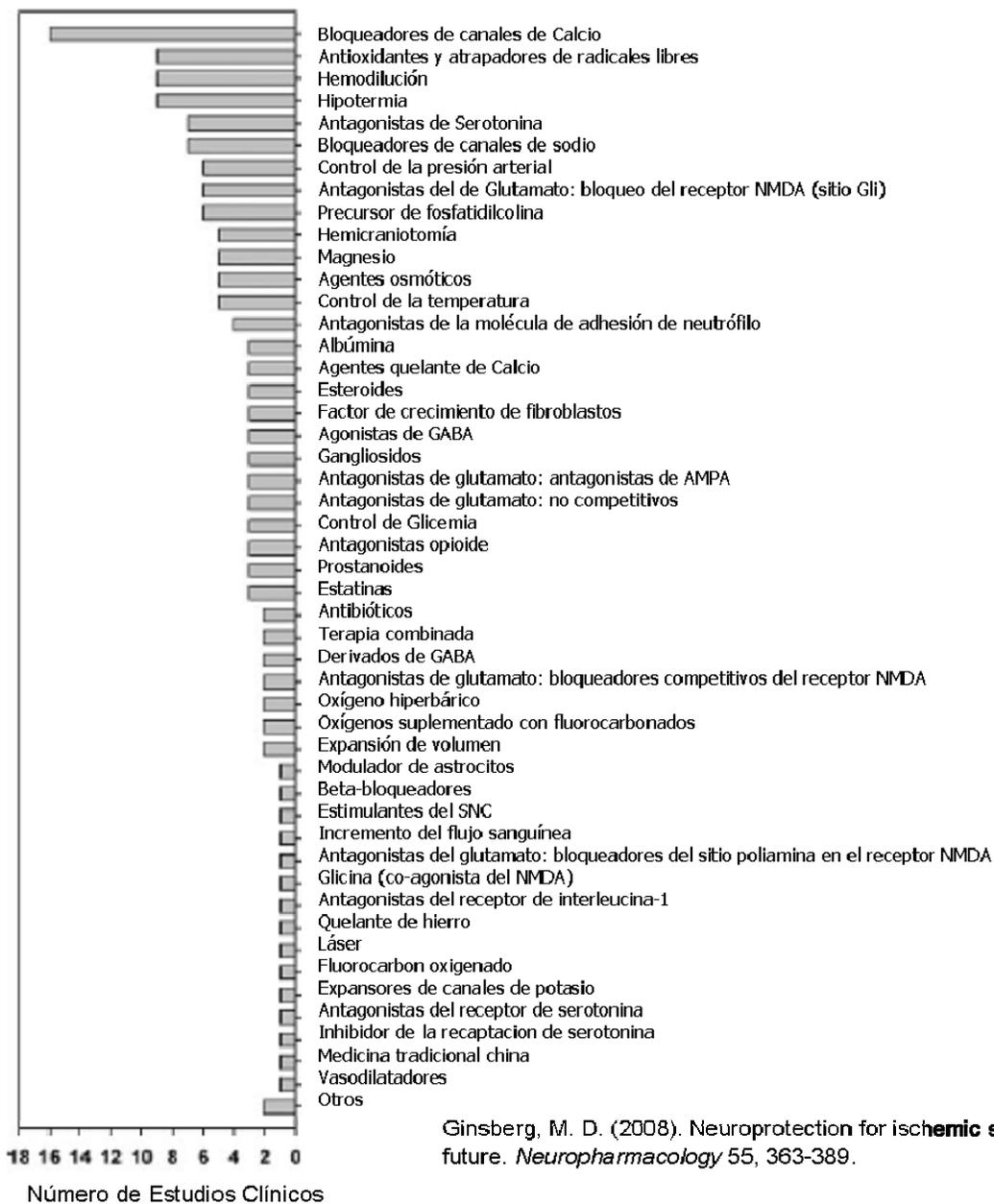
Anexo A

Representación gráfica de los mecanismos fisiopatológicos de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Modificado de Kiernan, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377, 942-955 y traducido para este documento.



Anexo B

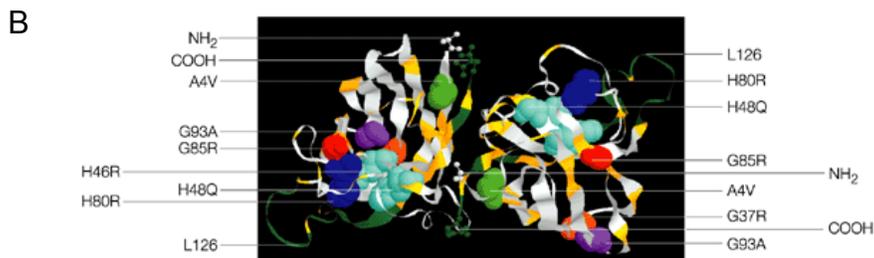
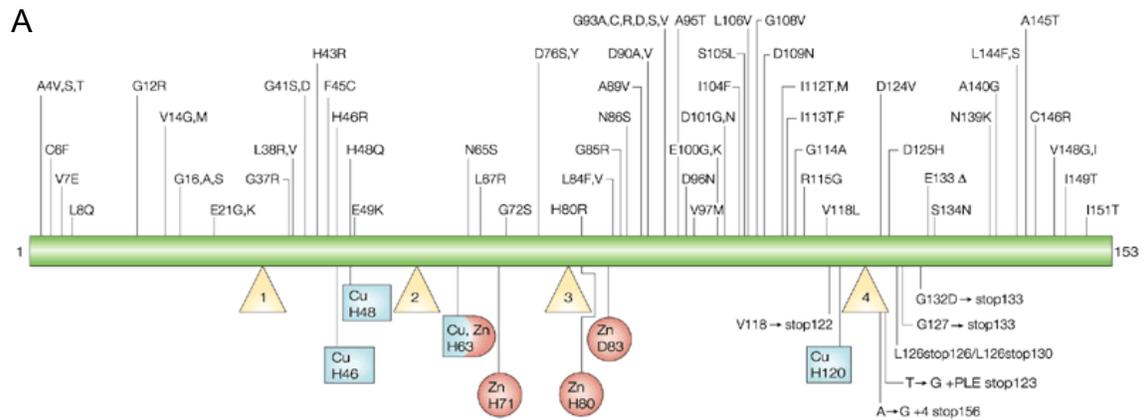
Estudios clínicos que han aplicado estrategias neuroprotectoras en enfermedad cerebrovascular. Esquema modificado de Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008 Sep;55(3):363-89. Esquema traducido para este documento.



Ginsberg, M. D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55, 363-389.

Anexo C

A: Representación del polipéptido SOD1 y de las mutaciones más importantes en el origen de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. B: Representación de esas mutaciones en la estructura tridimensional de la SOD1. Esquema modificado de Don W. Cleveland y Jeffrey D. Rothstein Nature Reviews Neuroscience 2, 806-819 (November 2001).



Anexo D.

Evolución en el tiempo de los eventos clínicos y neuropatológicos que experimenta el ratón transgénico SOD1 G93A. Figura modificada de Turner, B. J. y Talbot, K. (2008). *Prog. Neurobiol.* 85, 94-134 y traducida para este documento.

