



CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Área de Investigaciones Biomédicas

División de Farmacéuticos

Título:

**“EFECTOS CITOPROTECTORES DEL PÉPTIDO GHRP6 EN MODELOS
DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y HEPÁTICAS”**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Autora: Lic. Danay Cibrián Vera

Tutores: Dra. Olga Sonia León Fernández

Dr. Jorge Berlanga Acosta

CIUDAD DE LA HABANA, CUBA

AÑO 2009

*Hay una fuerza motriz más poderosa que
el vapor, la electricidad y la energía atómica:
la voluntad.*

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis ha sido posible gracias a la cooperación de numerosas instituciones y profesionales de diversas áreas del conocimiento. La participación del Dr. Juan Valiente Mustelier, del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, del Dr. Luis Guevara González, del Hospital Hermanos Ameijeiras, y del Dr. Ángel Abreu Cruz, del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ); fue decisiva para el desarrollo de los estudios en modelos de enfermedades cardiovasculares. Igualmente debemos agradecer el apoyo brindado por la dirección de las instituciones anteriormente mencionadas. El Instituto de Investigaciones Porcinas fue también de gran ayuda en la realización del modelo de infarto en cerdos, así como la participación del Dr. Heberto Domínguez, perteneciente a esta institución. La Dra. Olga Sonia León, junto a otros compañeros del Centro de Investigaciones y Estudios Biológicos del Instituto de Farmacia y Alimentos, compartieron las ideas y esfuerzos que hicieron posible el desarrollo de los estudios de Isquemia-Reperusión hepática, así como las evaluaciones del estado redox celular. La cooperación del Dr. Bienvenido Grá, del Instituto Nacional de Gastroenterología, y de la Dra. Rosa Maria Coro, del Instituto de Neurología y Neurocirugía; fue decisiva en la evaluación de los modelos de Cirrosis Hepática. A la Dra. Dayana Ugarte y a la Dra. Yolanda Cruz, del CIMEQ, que facilitaron las evaluaciones por ultrasonido y las determinaciones bioquímicas en el suero de los animales, nuestro sincero agradecimiento. De igual modo, quisiéramos agradecer al especialista en Anatomía Patológica del CIGB, el Dr. José Suárez Alba, ya que sin su abnegada y excelente labor no se podrían realizar estos estudios de citoprotección tisular. La realización de este trabajo contó además con el apoyo de la dirección del área de Investigaciones Biomédicas así como del Grupo de Negociación de Proyectos del CIGB. A todos los compañeros del proyecto de Cicatrización y Citoprotección del CIGB que apoyaron el trabajo, así como a los compañeros del Bioterio del CIGB, nuestro más sincero agradecimiento. Por último, en lo personal, quisiera agradecer a mis tutores, la Dra. Olga Sonia León y el Dr. Jorge Berlanga Acosta; quienes me brindaron sus enseñanzas y afectos, haciendo posible el desarrollo de este trabajo de tesis.

Una vez más,

A todos,

Muchas Gracias.

SÍNTESIS

El infarto agudo del miocardio y la miocardiopatía dilatada, así como el daño inducido por la hipoxia y la cirrosis del hígado; constituyen causas importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En este trabajo de tesis se evaluó el efecto citoprotector del péptido GHRP6 en modelos animales que remedan estas enfermedades. Los resultados obtenidos indicaron la potencialidad farmacológica del péptido GHRP6 de reducir la talla del infarto, así como de prevenir y revertir el remodelado ventricular y la caída de la función contráctil del miocardio, que caracterizan a la miocardiopatía dilatada, inducida en este caso por el agente antineoplásico doxorrubicina. Igualmente se constató la potencialidad del GHRP6 de reducir la necrosis de los hepatocitos inducida por la isquemia, y de atenuar la instauración de un síndrome de daño múltiple de órganos asociado a la reperfusión del hígado. Se demostró también que el GHRP6 es capaz de prevenir y revertir el depósito de material fibrótico en el hígado. Los mecanismos moleculares de la acción citoprotectora del péptido GHRP6 involucran su acción favorable sobre el balance redox celular, así como la inducción de rutas de señales que atenúan la afectación mitocondrial, con lo cual se favorece la supervivencia de las células ante las diferentes formas de daño.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- ADN** - Ácido dexosirribonucleico
- ADP** - Adenosina Di-Fosfato (siglas del inglés: *Adenosine Di-Phosphate*)
- ALAT** - Alanina Aminotransferasa
- AMP** - Adenosina Mono-Fosfato (siglas del inglés: *Adenosine Mono-Phosphate*)
- ARN** - Ácido ribonucleico
- ASAT** - Aspartato Aminotransferasa
- ATP** - Adenosina Tri-Fosfato (siglas del inglés: *Adenosine Tri-Phosphate*)
- CCL₄** - Tetracloruro de Carbono
- CEH** - Células estrelladas hepáticas
- CK-MB** - Creatina quinasa-isoforma MB (siglas del inglés: *Creatine Kinase-isoenzyme MB*)
- CRP** - Proteína C Reactiva (siglas del inglés: *C-Reactive Protein*)
- CTGF** - Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (siglas del inglés: *Connective Tissue Growth Factor*)
- DdVI** - Diámetro Diastólico del Ventrículo Izquierdo
- DE** - Desviación Estándar
- DMO** - Daño Múltiple de Órganos
- DsVI** - Diámetro Sistólico del Ventrículo Izquierdo
- DX** - Doxorrubicina
- EBM** - Estandarización del biomodelo
- ECG** - Electrocardiograma
- ECO** - Ecocardiografía
- ECV** - Enfermedades cardiovasculares
- EEM** - Error Estándar de la Media
- ERN** - Especies Reactivas del Nitrógeno
- ERO** - Especies Reactivas del Oxígeno
- FEVI** - Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo
- GH** - Hormona de Crecimiento (siglas del inglés: *Growth Hormone*)
- GHRH** - Hormona Liberadora de la Hormona de Crecimiento (siglas del inglés: *Growth Hormone Releasing Hormone*)
- GHRP** - Péptidos Secretagogos de la Hormona de Crecimiento (siglas del inglés: *Growth Hormone Releasing Peptides*)
- GHRP1** - Péptido Secretagogo de la Hormona de Crecimiento-1 (siglas del inglés: *Growth Hormone Releasing Peptide-1*)
- GHRP2** - Péptido Secretagogo de la Hormona de Crecimiento-2 (siglas del inglés: *Growth Hormone Releasing Peptide-2*)
- GHRP6** - Péptido Secretagogo de la Hormona de Crecimiento-6 (siglas del inglés: *Growth Hormone Releasing Peptide-6*)
- GHS** - Secretagogos de la Hormona de Crecimiento (siglas del inglés: *Growth Hormone Secretagogues*)

- GHS-R** - Receptor de los Secretagogos de la Hormona de Crecimiento (siglas del inglés: *Growth Hormone Secretagogue-Receptor*)
- GPx** - Glutación Peroxidasa
- GRd** - Glutación Reductasa
- GSH** - Glutación reducido
- GSSG** - Glutación oxidado
- G.S.d/s** - Grosor del Septum intra-ventricular en diástole/sístole
- G.PP.d/s** - Grosor de la Pared Posterior del ventrículo izquierdo en diástole/sístole
- HIF1 α** - Factor Inducible por la Hipoxia-1 α (siglas del inglés: *Hypoxia Inducible Factor*)
- HPT** - Hidroperóxidos totales
- ICC** - Insuficiencia Cardíaca Congestiva
- IFU** - Índice de Fibrosis por Ultrasonido
- IGF-1** - Factor de Crecimiento semejante a la Insulina-tipo 1 (siglas del inglés: *Insuline-like Growth Factor-1*)
- IMA** - Infarto Agudo del Miocardio o Infarto Miocárdico Agudo
- IL** - Interleucinas
- i.p.** - Intraperitoneal
- IP3** - Inositol-1,4,5 tri-fosfato (siglas del inglés: *Inositol 1,4,5 tri-phosphate*)
- I/R** - Isquemia/Reperusión
- IRVI** - Índice de Remodelado del Ventrículo Izquierdo
- MCD** - Miocardiopatía Dilatada
- MDA** - Malondialdehído
- MEC** - Matriz Extracelular
- MET** - Microscopía Electrónica de Transmisión
- MMP13** - Metaloproteasa de Matriz Extracelular-13 (siglas del inglés: *Matrix Metalloprotease-13*)
- MPO** - Mieloperoxidasa
- NADPH** - Nicotinamina Adenina Dinucleótido Fosfato (siglas del inglés: *Nicotinamide Adenine dinucleotide Phosphate*)
- NBT** - Nitro Blue Tetrazolium
- NOS** - Óxido Nítrico Sintasa (siglas del inglés *Nitric Oxide Synthase*)
- PAOP** - Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas
- PBS** - Solución salina tamponada con fosfatos (siglas del inglés: *Phosphate-Buffered Saline*).
- p.c** - Peso corporal
- PDGF** - Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (siglas del inglés: *Platelet-Derived Growth Factor*)
- PI3K** - Fosfatidil inositol quinasa-3 (siglas del inglés: *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*)
- PKB** - Proteína quinasa B (siglas del inglés: *Protein Kinase B*)
- PKC** - Proteína quinasa C (siglas del inglés: *Protein Kinase C*)
- PLC** - Fosfolipasa C (siglas del inglés: *Phospholipase C*)

- PPAR** - Receptor Activado por Proliferador de Peroxisomas (siglas del inglés: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*)
- PPL** - Potencial de Peroxidación Lipídica
- PT** - Proteínas totales
- PTPM** - Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial
- rpm** - Revoluciones por minuto
- RT-PCR** - Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas del inglés: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)
- s.c.** - Subcutáneo
- SOD** - Superóxido Dismutasa
- SODCu/Zn** - Superóxido Dismutasa, isoforma dependiente de Cu/Zn
- SODMn** - Superóxido Dismutasa, isoforma dependiente de manganeso
- SRIS** - Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
- SSF** - Solución Salina Fisiológica (Solución de cloruro de sodio al 0,9 %)
- TGF- β** - Factor de crecimiento transformante- β (siglas del inglés *Transforming Growth Factor- β*)
- TNF α** - Factor de Necrosis Tumoral-Alfa (siglas del inglés: *Tumor Necrosis Factor*)
- VD** - Ventriculo Derecho
- VI** - Ventriculo Izquierdo
- VLDL** - Lipoproteínas de muy baja densidad (siglas del inglés: *Very Low Density Lipoprotein*)
- XD** - Xantina Deshidrogenasa
- XO** - Xantina Oxidasa

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
<u>II.1 Secretagogos de la Hormona de Crecimiento</u>	7
<i>II.1.1 Generalidades</i>	7
<i>II.1.2 Receptores identificados para los GHRP</i>	7
<i>II.1.3 Acciones endocrinas de los GHRP</i>	8
<i>II.1.4 Acciones no endocrinas de los GHRP</i>	9
<u>II.2 Especies Reactivas del Oxígeno y estrés oxidativo</u>	11
<i>II.2.1 Generalidades</i>	11
<i>II.2.2 Sistemas generadores de Especies Reactivas del Oxígeno</i>	11
<i>II.2.3 Sistemas generadores de Especies Reactivas del Nitrógeno</i>	12
<i>II.2.4 Daño celular inducido por las Especies Reactivas del Oxígeno</i>	13
<i>II.2.5 Sistemas de defensa antioxidante</i>	13
<u>II.3 Fisiopatología del daño inducido por la Isquemia/Reperusión en los tejidos</u>	14
<i>II.3.1 Generalidades</i>	14
<i>II.3.2 Alteraciones celulares durante la Isquemia/Reperusión</i>	14
<i>II.3.3 Particularidades del daño por Isquemia/Reperusión del miocardio</i>	16
<i>II.3.4 Particularidades del daño por Isquemia/Reperusión del hígado</i>	18
<u>II.4 Miocardiopatía Dilatada</u>	19
<i>II.4.1 Generalidades</i>	19
<i>II.4.2 Miocardiopatía Dilatada inducida por la Doxorubicina</i>	19
<u>II.5 Cirrosis Hepática</u>	21
<i>II.5.1 Generalidades</i>	21
<i>II.5.2 Fisiopatología de la fibrosis hepática</i>	22
<i>II.5.3 Modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono</i>	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
<u>III.1 Diseño Experimental de la Tesis</u>	25
<u>III.2 Reactivos</u>	25
<i>III.2.1 Sustancias químicas administradas a los animales</i>	25
<u>III.3 Animales de experimentación</u>	26
<u>III.4 Procesamiento de las muestras</u>	26

<i>III.4.1 Muestras para evaluación histológica.....</i>	26
<i>III.4.2 Muestras para evaluación por Microscopía Electrónica de Transmisión.....</i>	26
<i>III.4.3 Muestras de suero para evaluaciones bioquímicas.....</i>	26
<i>III.4.4 Muestras para evaluar parámetros indicadores del estrés oxidativo.....</i>	27
<i>III.4.5 Muestras para evaluar la expresión transcripcional de genes por la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....</i>	27
<u>III.5 Evaluación de los efectos del GHRP6 en modelos experimentales de enfermedades cardiovasculares.....</u>	28
<i>III.5.1 Modelo experimental de IMA en cerdos.....</i>	28
• <i>Protocolo de inducción del IMA.....</i>	28
• <i>Descripción de las fases del ensayo y los grupos experimentales.....</i>	29
• <i>Determinación de las dimensiones del Infarto.....</i>	30
• <i>Evaluaciones electrocardiográficas.....</i>	30
• <i>Evaluación histológica del miocardio.....</i>	31
• <i>Evaluaciones bioquímicas en el suero.....</i>	31
• <i>Evaluación del estrés oxidativo en el miocardio.....</i>	31
• <i>Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el miocardio.....</i>	31
<i>III.5.2 Modelo experimental de Miocardiopatía Dilatada inducida por la administración de la Doxorrubicina en ratas.....</i>	32
• <i>Protocolo de inducción de la Miocardiopatía Dilatada.....</i>	32
• <i>Descripción de las fases del ensayo y los grupos experimentales.....</i>	32
• <i>Evaluación del miocardio por ecocardiografía.....</i>	33
• <i>Evaluaciones histológicas.....</i>	34
• <i>Evaluación del miocardio por Microscopía Electrónica de Transmisión.....</i>	35
• <i>Evaluaciones bioquímicas en el suero.....</i>	35
• <i>Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el miocardio.....</i>	35
<u>III.6 Evaluación de los efectos del GHRP6 en modelos experimentales de enfermedades hepáticas.....</u>	35
<i>III.6.1 Modelo experimental de Isquemia/Reperusión hepática y Daño Múltiple de Órganos.....</i>	35
• <i>Protocolo de inducción de la Isquemia /Reperusión hepática.....</i>	35
• <i>Descripción de los grupos experimentales.....</i>	36
• <i>Estudios histológicos.....</i>	36
• <i>Evaluaciones bioquímicas en el suero.....</i>	37
• <i>Evaluaciones bioquímicas en los tejidos.....</i>	37
• <i>Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el hígado.....</i>	37

III.6.2 Modelo experimental de Cirrosis Hepática inducida por la administración de Tetracloruro de Carbono en ratas	38
• <i>Protocolo de inducción de la Cirrosis Hepática</i>	38
• <i>Descripción de las fases del ensayo y los grupos experimentales</i>	38
• <i>Evaluación del hígado por ultrasonido</i>	40
• <i>Evaluación morfológica de los hígados cirróticos por laparotomía</i>	40
• <i>Evaluaciones histológicas en la Cirrosis</i>	40
• <i>Estudios de inmunohistoquímica</i>	41
• <i>Evaluación del hígado por Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	41
• <i>Evaluaciones bioquímicas en el suero</i>	41
• <i>Evaluación del estrés oxidativo en el hígado</i>	42
• <i>Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el hígado</i>	42
III.7 Procesamiento Estadístico de los datos	42
IV. RESULTADOS	43
IV.1 <u>Evaluación del péptido GHRP6 en un modelo de IMA en cerdos</u>	43
IV.1.1 Resultados del examen clínico pre-experimental de los cerdos del ensayo	43
IV.1.2 Caracterización del Modelo Porcino de IMA	43
• <i>Resultados de sobrevida en la fase de EBM</i>	43
• <i>Resultados de los estudios morfohistológicos en la fase de EBM</i>	43
• <i>Resultados de las evaluaciones electrocardiográficas en la fase de EBM</i>	44
IV.1.3 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en el modelo porcino de IMA	44
• <i>Resultados de sobrevida</i>	44
• <i>Impacto del GHRP6 en las dimensiones del IMA</i>	44
• <i>Efecto del GHRP6 en los parámetros del ECG</i>	45
• <i>Estudio histológico del miocardio</i>	47
• <i>Efectos del GHRP6 sobre los niveles séricos de CK-MB y CRP</i>	48
• <i>Influencia del GHRP6 sobre el estrés oxidativo del miocardio</i>	49
• <i>Efectos del GHRP6 en la expresión transcripcional miocárdica del gen IGF-1</i>	50
IV.2 <u>Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en la prevención y reversión de la Miocardiopatía Dilatada inducida por la administración de Doxorubicina en ratas</u>	51
IV.2.1 Estudio por ecocardiografía del miocardio	51
IV.2.2 Resultados del estudio histológico del miocardio	53
IV.2.3 Efectos del GHRP6 sobre el peso corporal y el índice de peso de varios órganos	53

<i>IV.2.4 Resultados del estudio histológico en órganos extra-cardiacos</i>	54
<i>IV.2.5 Efectos del GHRP6 en la sobrevida</i>	55
<i>IV.2.6 Influencia del GHRP6 sobre los marcadores del estado redox celular</i>	56
<i>IV.2.7 Efectos del GHRP6 en la expresión transcripcional miocárdica de los genes Bcl-2 y Bax</i>	57
<i>IV.2.8 Estudio del miocardio por Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	58
<u>IV.3 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en un modelo experimental de Isquemia/Reperusión hepática y Daño Múltiple de Órganos</u>	59
<i>IV.3.1 Resultados histológicos en el hígado</i>	59
<i>IV.3.2 Evaluaciones histológicas en órganos remotos al sitio de la Isquemia/Reperusión</i>	60
<i>IV.3.3 Determinación de marcadores circulantes del daño hepático y renal</i>	61
<i>IV.3.4 Influencia del GHRP6 en el estrés oxidativo del hígado sometido a la isquemia</i>	62
<i>IV.3.5 Evaluación de la expresión transcripcional de los genes HIF-1α, IGF-1, PI3K y PKB en el hígado</i>	64
<u>IV.4 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en la prevención y reversión de la Cirrosis Hepática inducida por la administración de CCL₄ en ratas</u>	65
<i>IV.4.1 Resultados del estudio del hígado por ultrasonido</i>	65
<i>IV.4.2 Estudios histológicos de los hígados cirróticos</i>	67
<i>IV.4.3 Marcadores séricos del daño y de la función hepática</i>	69
<i>IV.4.4 Efectos del GHRP6 sobre el estrés oxidativo hepático</i>	71
<i>IV.4.5 Resultados inmunohistoquímicos en la Cirrosis Hepática</i>	72
<i>IV.4.6 Influencia del GHRP6 en la expresión transcripcional de los genes TGF-β, CTGF, SODMn y MMP13 en la Cirrosis Hepática</i>	73
<i>IV.4.7 Estudio del hígado por Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	74
V. DISCUSIÓN	75
VI. CONCLUSIONES	97
VII. RECOMENDACIONES	98
Lista de Referencias	99
Anexos	
Avales y Distinciones del Trabajo de Tesis	

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas, no transmisibles, son causas importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Dentro de estas se destacan las patologías del músculo cardiaco, como el Infarto Miocárdico Agudo (IMA) y las miocardiopatías; así como el daño por la hipoxia y la cirrosis del hígado. Tanto en los fenómenos agudos de Isquemia/Reperusión (I/R) como en las enfermedades crónicas, se produce una pérdida importante de la viabilidad celular que provoca la disfunción de estos órganos e implica una alta letalidad. Actualmente no existen agentes citoprotectores, aprobados para uso clínico, que sean capaces de inducir la tolerancia de las células ante las diferentes formas de daño. La citoprotección de los tejidos es, por tanto, un nicho huérfano y relevante en la clínica de estas entidades patológicas.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel mundial, y provocan la pérdida anual de 20 millones de personas como promedio (Antman y cols., 2008). En Cuba, las ECV constituyen también la primera causa de mortalidad, con un promedio de 20 000 muertes anuales durante los años 2001 al 2007 (Anuario Estadístico de Cuba, 2007). El IMA se define como la necrosis del músculo cardiaco producida por la isquemia de la arteria coronaria (Braunwald E, 2005). Esta entidad es uno de los principales contribuyentes a la morbilidad y mortalidad de este grupo de enfermedades (Pollack, Jr. y Braunwald, 2008). Actualmente se estima que más de ocho millones de habitantes de los Estados Unidos de América (EE.UU.) han sufrido un infarto (Rosamond y cols., 2008). El restablecimiento del flujo sanguíneo es indispensable para limitar la muerte del miocardio sometido a una oclusión coronaria, ya sea por un tratamiento trombolítico o mediante técnicas de intervención intracoronaria percutáneas (Keeley y cols., 2006). Sin embargo, el beneficio de la reperusión coronaria está atenuado por la ocurrencia del daño letal por reperusión (Yellon y Hausenloy, 2007). Por tal motivo, el daño por I/R constituye aún un problema sin resolver en la práctica clínica, y la búsqueda de agentes cardioprotectores que permitan disminuir el área de infarto sigue siendo de gran necesidad.

Las miocardiopatías son también causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Rosamond y cols., 2008). Dentro de este grupo de varias patologías se encuentra la Miocardiopatía Dilatada (MCD), enfermedad que se caracteriza por la dilatación de los ventrículos y el afinamiento de las paredes del músculo cardiaco, lo que conduce a una marcada disminución de la función contráctil (Towbin y Bowles, 2006). Este padecimiento representa más de 10 000 muertes y cerca de 50 000 personas hospitalizadas anualmente, solo en los EE.UU. (Cutler y cols., 2006). Entre los

múltiples agentes nocivos que pueden inducir una MCD tóxica se encuentran las antraciclinas, potentes agentes antineoplásicos (Drimal y cols., 2006; Takemura y Fujiwara, 2007). El alto grado de cardiotoxicidad de estos fármacos induce una forma característica de MCD dependiente de la dosis, la cual debuta en más del 20% de los pacientes sometidos a quimioterapia, con una mortalidad del 50% a los dos años (Jensen y cols., 2002). Estas cifras evidencian la necesidad de agentes cardioprotectores que permitan atenuar la muerte de los cardiomiocitos inducida por sustancias tóxicas, además de favorecer la contractilidad del miocardio.

Al igual que el músculo cardiaco, el hígado es un órgano vital, sin sucedáneo, cuyo correcto funcionamiento resulta imprescindible para la homeostasis del organismo. Existen numerosas situaciones clínicas en las que el hígado es sometido a una situación de isquemia, como es el caso de las cirugías para realizar hepatectomías parciales y trasplante hepático. Hoy en día, después del éxito de las terapias de inmunosupresión, la afectación de la integridad morfo-funcional del injerto como resultado del episodio de I/R, es el principal factor limitante en el mundo para el éxito de la cirugía de trasplante; la cual, por otra parte, ha experimentado un incremento dramático en los últimos años (Barber y cols., 2007). En las situaciones patológicas donde se disminuye el flujo sanguíneo del hígado, aparecen lesiones no sólo en el órgano diana sino también sistémicas, las que pueden conducir a un síndrome de Daño Múltiple de Órganos (DMO) (Spapen, 2008).

La cirrosis representa el estadio final de varias enfermedades crónicas del hígado, como las hepatitis por abuso del consumo de alcohol o por infección viral (Friedman, 2003). Esta enfermedad se caracteriza por la conversión de la arquitectura normal del hígado en nódulos estructuralmente anómalos (Anthony y cols., 1977). La cirrosis es la novena causa de mortalidad en los EE.UU., donde es responsable de aproximadamente 35 000 muertes cada año (Mendez-Sanchez y cols., 2007). En Cuba, esta entidad constituye la décima causa de muerte, provocando 1000 fallecimientos anuales como promedio desde el año 2001 al 2007 (Anuario Estadístico de Cuba, 2007). La única alternativa que existe actualmente en la clínica para inducir la regresión de la fibrosis es remover el agente causal del daño hepático (Friedman, 2007). Por tanto, todos los esfuerzos que se inviertan en el desarrollo de nuevas terapias hepatoprotectoras y antifibróticas están justificados.

Existen elementos comunes en la fisiopatología de las enfermedades del músculo cardiaco y del hígado referidas anteriormente. Tanto en los fenómenos de I/R, como en la MCD y la cirrosis, se produce un incremento significativo de las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO); las que provocan daños oxidativos a los componentes celulares, promueven una respuesta inflamatoria que

amplifica el daño, y comprometen la integridad de las mitocondrias. Estas alteraciones inducen la muerte de cardiomiocitos y hepatocitos; la cual ocurre fundamentalmente por necrosis en el caso del daño agudo por la I/R, y por apoptosis en las enfermedades crónicas.

El GHRP6 es un péptido sintético de seis aminoácidos que es miembro de la familia de agentes secretagogos de la Hormona de Crecimiento (GH) (Bowers, 1998). Además de promover la secreción de la GH, las evidencias indican que el GHRP6 y sus análogos sintéticos (GHRP1, GHRP2, hexarelina) pueden ejercer acciones cardiovasculares; como es el incremento de la contractilidad del miocardio (Bisi y cols., 1999; Locatelli y cols., 1999; Broglio y cols., 2001), y la prevención de la disfunción sistólica y diastólica inducida por la isquemia o por una MCD familiar (Tivesten y cols., 2000; Shen y cols., 2003b; Iwase y cols., 2004). Los mecanismos moleculares que subyacen tras estos efectos cardioprotectores de los GHRP no están identificados completamente. No obstante, estos resultados previos ofrecen una perspectiva interesante sobre la potencial utilidad del tratamiento con el péptido GHRP6 en la reducción de la talla final del infarto inducido por la isquemia coronaria aguda; así como en la atenuación de la MCD provocada por los fármacos antineoplásicos.

El receptor específico para el GHRP6 y los restantes agentes secretagogos de la GH (GHS-R1a), que está presente en la hipófisis anterior y en el hipotálamo, donde media las acciones endocrinas de estos péptidos (Howard y cols., 1996); se expresa también en el músculo cardiaco y otros tejidos, exceptuando el hígado (Gnanapavan y cols., 2002). No obstante, los GHRP se unen con alta afinidad al receptor CD36, el cual parece mediar las acciones de estos péptidos en el músculo cardiaco (Bodart y cols., 2002). Este segundo receptor se expresa de forma ubicua en el organismo (Febbraio y cols., 2001), lo cual indica la potencialidad de los GHRP de ejercer acciones farmacológicas multiorgánicas, al ser administrados de forma sistémica. Teniendo en cuenta la disponibilidad de al menos un receptor para el GHRP6 en el hígado, es posible considerar que, al igual que en el miocardio, este péptido podría actuar como un agente hepatoprotector ante situaciones de daño por I/R, así como atenuar la fibrosis del hígado.

Tomando en consideración estos antecedentes, formulamos la siguiente,

HIPÓTESIS

“La administración sistémica del péptido GHRP6 es capaz de ejercer efectos citoprotectores en el músculo cardiaco y en el hígado, que permiten atenuar el daño agudo asociado a la isquemia y el daño crónico inducido por agentes tóxicos, en ambos órganos”.

A partir de esta hipótesis se planteó el siguiente,

OBJETIVO GENERAL

“Estudiar los efectos citoprotectores ejercidos por el péptido GHRP6 en modelos de enfermedades cardíacas y hepáticas, asociadas a episodios de I/R y a la administración crónica de agentes tóxicos”.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar, en modelos experimentales, la eficacia del tratamiento con el péptido GHRP6 en la enfermedad por oclusión aguda de la arteria coronaria, así como en la prevención y reversión de la Miocardiopatía Dilatada inducida por un fármaco antineoplásico.
2. Evaluar las acciones preventivas del GHRP6 en la I/R hepática y el subsiguiente DMO, así como sus efectos en la prevención y reversión de la fibrosis del hígado, en modelos experimentales.
3. Determinar la participación del GHRP6 en la regulación del estado redox celular, y su impacto en la preservación morfológica de las mitocondrias.
4. Investigar la participación de genes inductores de sobrevida celular en los efectos citoprotectores del GHRP6.
5. Estudiar el mecanismo de acción del GHRP6 involucrado en la reducción de la fibrosis del hígado.

NOVEDAD CIENTÍFICA

En este trabajo de tesis se demuestra, por primera vez, empleando un modelo animal robusto *ad integrum*, que el GHRP6 es capaz de disminuir significativamente el área del IMA producido por la oclusión aguda de la arteria coronaria en animales sanos. Se demuestra también que la administración concomitante y terapéutica del GHRP6 es capaz de prevenir y revertir, respectivamente, la disfunción contráctil del miocardio producida por la administración de un fármaco antineoplásico, lo cual no se ha referido anteriormente en la literatura. Los resultados de estos trabajos indicaron, también por primera vez, que el hígado es un órgano blanco de las acciones citoprotectoras del GHRP6, tan relevante como el propio músculo cardíaco. Estos trabajos tienen la primicia en demostrar el potente efecto hepatoprotector que ejerce el GHRP6 en modelos de daño agudo por I/R; así como en atenuar el DMO que se instaura con la reperfusión del hígado. De esta forma, se reportaron por primera vez los efectos citoprotectores ejercidos por el GHRP6 en órganos no evaluados hasta el momento, como el intestino delgado, los pulmones y los riñones. Además, se

demonstró que el GHRP6 es capaz de prevenir y revertir la cirrosis hepática. Este resultado, que es extremadamente novedoso, inicia un nuevo campo de estudios sobre las potenciales aplicaciones de estas moléculas en el tratamiento de las enfermedades de acumulación de material de depósito. Estos trabajos son también los primeros en reportar que el GHRP6 ejerce un marcado efecto antioxidante, mediado principalmente por la estimulación específica de la enzima SODMn; lo cual es relevante en su acción terapéutica, tanto en las enfermedades cardiovasculares como hepáticas. Se aportan también nuevos conocimientos sobre el mecanismo molecular que permite al GHRP6 inducir la sobrevida celular, el cual involucra la activación de la ruta PI3K/PKB, el incremento en la expresión del gen HIF-1 α y del gen anti-apoptótico Bcl-2. La evaluación por microscopía electrónica de muestras de tejido cardíaco y hepático de animales tratados con el GHRP6 demostró, por primera vez, que la citoprotección ejercida por este péptido, y la propia regulación del estado redox celular, se asocian con la preservación de la integridad mitocondrial. En el caso de la cirrosis hepática, se demostró que la acción antifibrótica del péptido GHRP6 involucra la estimulación selectiva de la enzima MMP13, la disminución del número de células inflamatorias y productoras de matriz extracelular activadas; así como la reducción de la expresión de las principales citocinas profibrogénicas (TGF- β y CTGF). Estos resultados del GHRP6 en la enfermedad fibrótica del hígado no estaban referidos anteriormente en la literatura internacional.

APORTE TEÓRICO

Uno de los principales aportes teóricos de esta tesis es la demostración de que la acción cardioprotectora del GHRP6 implica la atenuación de la muerte de los cardiomiocitos, tanto por necrosis como por apoptosis; además de los efectos sobre la contractilidad del miocardio, previamente referidos. Otro aporte teórico relevante es la demostración, por primera vez, de que el GHRP6 es un potente hepatoprotector, capaz incluso de provocar la atenuación y regresión de la fibrosis del hígado. Además, se aportan nuevos conocimientos básicos sobre el mecanismo molecular de la acción citoprotectora del péptido GHRP6, tanto en el corazón como en el hígado. Entre ellos se destaca el marcado efecto antioxidante que ejerce esta molécula, mediado por la estimulación específica de la enzima SODMn; hallazgo que ha sido identificado y reportado por primera vez en este trabajo. La activación de genes inductores de sobrevida como el HIF-1 α , la ruta PI3K/PKB, y Bcl-2, son también resultados inéditos que se relacionan con el mecanismo molecular de la acción citoprotectora ejercida por el GHRP6. La demostración de que en las células tratadas con este péptido se observa una mayor preservación de las mitocondrias, tanto en el hígado como en

el miocardio, es un resultado sin antecedentes en la literatura; que se asocia a su vez con los efectos reguladores del GHRP6 sobre el estado redox celular y las rutas inductoras de sobrevida. Por último, se demostró que el novedoso efecto antifibrótico del GHRP6 está mediado por la activación específica de la MMP13, la atenuación de la expresión de las principales citocinas pro-fibrogénicas, TGF- β y CTGF, así como por la disminución de las células inflamatorias y productoras de matriz extracelular. Estos resultados son, indudablemente, solo el inicio de un nuevo campo de investigaciones para los GHRP.

APORTE PRÁCTICO Y SOCIAL

La citoprotección de los tejidos ante el daño producido por episodios de I/R o por la toxicidad de agentes químicos es aún una necesidad clínica no cubierta. El aporte práctico y social de estos resultados se basa en la demostración, a nivel preclínico, de la utilidad del GHRP6 en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y hepáticas, las que pueden tener además repercusión sistémica, y que constituyen importantes causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Los resultados de este trabajo de tesis conformaron el expediente de estudios de eficacia preclínica presentado a la entidad regulatoria cubana, para la solicitud de los ensayos clínicos con el GHRP6. Recientemente se concluyó el ensayo clínico Fase I en voluntarios sanos, en el cual se demostró que el GHRP6 es un tratamiento bien tolerado y libre de efectos adversos. La reproducción de las acciones citoprotectoras de este péptido en estudios clínicos, constituiría una incuestionable contribución a la medicina, así como un indudable beneficio al tratamiento de cardiópatas crónicos, infartados, pacientes con indicación de quimioterapia, trasplantados, y pacientes con fibrosis hepática.

La tesis cuenta con un total de 98 páginas, distribuidas en los siguientes acápite: Introducción (6 páginas), Revisión Bibliográfica (18 páginas), Materiales y Métodos (18 páginas), Resultados (32 páginas), Discusión (22 páginas), Conclusiones (1 página) y Recomendaciones (1 página). El documento incluye además la Síntesis, la Tabla de Contenido, el Glosario de Términos, los Anexos, la lista de Referencias Bibliográficas y el listado de los Avals del trabajo de tesis.

Los resultados que conforman esta tesis han sido objeto de dos patentes, tres publicaciones en revistas arbitradas y un logro de la Academia de Ciencias de Cuba. Además, todos estos trabajos fueron considerados como logros científicos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, y se presentaron en eventos internacionales relacionados con las temáticas de enfermedades cardiovasculares y hepáticas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Secretagogos de la Hormona de Crecimiento

II.1.1 Generalidades.

A principio de los años 80 se descubrieron una serie de ligandos sintéticos, peptídicos y no peptídicos, conocidos en su conjunto como agentes secretagogos de la Hormona de Crecimiento (GHS), debido a su potente acción liberadora de esta hormona, demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* (Bowers y cols., 1984). La familia de los péptidos secretagogos de la GH (GHRP) incluye el GHRP1, el GHRP2, el GHRP6 y la hexarelina. Entre las moléculas no peptídicas con acción secretora de la GH se destacan el L-163,255 y el MK-0677 (Anexo 1), (Ghigo y cols., 1997).

El GHRP6, una de las moléculas más estudiadas de la familia de los GHS, es un péptido de seis aminoácidos cuya secuencia es: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ (Bowers y cols., 1984). Este péptido es una molécula soluble y de gran estabilidad, dada la presencia en su estructura de dos residuos de D-aminoácidos (Johansen y cols., 1998). Se ha demostrado que la liberación de la GH inducida por el GHRP6 y los restantes secretagogos es dependiente de la dosis, y altamente reproducible en todas las especies de mamíferos evaluadas hasta el momento, incluyendo la humana (Bowers, 1998). Esta acción se logra mediante la administración de los GHRP tanto por vía intravenosa, subcutánea, intranasal e incluso oral (Ghigo y cols., 1994). Actualmente, los GHRP son moléculas relevantes en la práctica clínica de enfermedades neuroendocrinas, tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de las mismas (Abs, 2003; Castro y cols., 2007).

La ghrelina, una molécula peptídica de 28 aminoácidos descubierta en 1999, es reconocida como el análogo natural de los GHS (Kojima y cols., 1999; Kojima y cols., 2001). Esta hormona se produce fundamentalmente en el estómago, aunque su expresión ha sido detectada en todos los tejidos estudiados (Gnanapavan y cols., 2002).

II.1.2 Receptores identificados para los GHRP.

En 1996 se identificó el receptor específico de los secretagogos de la GH (GHS-R), presente mayoritariamente en la hipófisis anterior y en el hipotálamo (Howard y cols., 1996). Existen al menos dos subtipos identificados para este receptor: el GHS-RIa, que es una proteína de 366 aminoácidos y que posee siete dominios transmembranarios, tres dominios intracelulares, y tres dominios extracelulares; y el GHS-RIb, que es una proteína de 289 aminoácidos y consta de cinco segmentos transmembrana solamente (McKee y cols., 1997). El GHS-RIa es el que media las acciones endocrinas de los secretagogos (Ong y cols., 1998). Por su parte, el GHS-RIb no se enlaza

ni responde a la ghrelina ni a los GHS y aún se desconoce su función. Ambos subtipos de receptores se expresan en tejidos extra-endocrinos. Curiosamente, el GHS-R_{1b} está distribuido de forma ubicua, mientras que el GHS-R_{1a} se localiza solo en páncreas, bazo y miocardio (Gnanapavan y cols., 2002).

El GHS-R es un receptor unido a proteína G_q y la unión de sus ligandos activa la vía de señalización de la fosfolipasa C (PLC), lo que provoca un incremento de la concentración de inositol-1,4,5 trifosfato (IP₃) así como la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Lei y cols., 1995; Wu y cols., 1997). Por mediación de esta ruta se produce un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular que facilita la liberación de la GH por los somatotropos (Herrington y Hille, 1994).

Se ha demostrado que existen sitios de unión adicionales para los GHRP en tejidos no endocrinos tales como: el miocardio, los pulmones, las arterias, el músculo esquelético, los riñones y el hígado (Bodart y cols., 1999; Papotti y cols., 2000). De acuerdo con su secuencia aminoacídica, esta nueva estructura se corresponde con el receptor CD36; el cual parece mediar, al menos, las acciones cardiovasculares de los GHRP (Bodart y cols., 2002). Este receptor es una glicoproteína de membrana de 84 000 Da, cuya expresión ha sido detectada en todos los tejidos evaluados. El CD36 pertenece a la familia de receptores “eliminadores” tipo B y participa en el metabolismo de los lípidos, el reconocimiento y eliminación de las células apoptóticas, la resistencia a la insulina, y la regulación de la angiogénesis (Febbraio y cols., 2001). La ghrelina no interactúa con el CD36, lo cual explica su menor efectividad como cardioprotector en comparación con los GHRP (Torsello y cols., 2003). Esto indica además, que existen similitudes pero también diferencias entre el ligando natural y los GHRP sintéticos, en cuanto a los mecanismos de transducción de señales que median sus acciones biológicas (Benso y cols., 2004). La amplia distribución que existe en el organismo del receptor CD36 sugiere que los GHRP pueden ejercer acciones regulatorias en muchos tejidos y órganos.

II.1.3 Acciones endocrinas de los GHRP.

La secreción pulsátil de la GH por la hipófisis es controlada por dos péptidos hipotalámicos con acciones antagónicas; la Somatostatina, que tiene una acción inhibitoria sobre la liberación de la GH, y la Hormona Liberadora de la GH (GHRH). El descubrimiento de los GHS, la ghrelina y el GHS-R_{1a}, puso de manifiesto la existencia de una tercera vía endocrina que controla la liberación pulsátil de esta hormona (Anderson y cols., 2004). Los GHRP intervienen tanto a nivel hipofisiario

como hipotalámico (Bowers, 1998). Estas moléculas sintéticas actúan sobre las neuronas secretoras de la GHRH en el hipotálamo, aumentando su secreción (Guillaume y cols., 1994; Conley y cols., 1995; Tannenbaum y Bowers, 2001). Se ha demostrado que existe un efecto sinérgico para los GHRP y la GHRH, tanto *in vitro* como *in vivo*, en cuanto a la liberación de la GH, cuando ambas moléculas son co-administradas (Bowers y cols., 1990; Mitani y cols., 1996). Como se explicó anteriormente, los GHRP y la ghrelina estimulan la liberación de la GH a nivel hipofisario incrementando la concentración de calcio intracelular en los somatotopos, mediado por la activación del GHS-RIa (Anderson y cols., 2005). Además de la liberación de la GH, los GHRP y la ghrelina inducen la secreción de prolactina, ACTH y cortisol (Arvat y cols., 1997).

II.1.4 Acciones no endocrinas de los GHRP.

El músculo cardíaco es uno de los blancos principales de los GHRP (Lucchesi, 2004). La existencia de al menos dos receptores para estas moléculas en el miocardio, el GHS-RIa y el CD36, indica la potencialidad de estos péptidos de ejercer acciones en el sistema cardiovascular.

Los primeros estudios realizados con los GHRP en el miocardio tenían el objetivo primario de inducir la liberación de la GH, dada la importancia de esta hormona para el corazón (Burger y cols., 2006; Cenci y cols., 2008). Sin embargo, los investigadores detectaron, desde un inicio, que las actividades cardiotróficas inducidas por los GHRP se manifestaban de forma independiente a la activación del eje GH/IGF-1 y en muchos casos eran superior a éste (De, V y cols., 1997; Berti y cols., 1998; Locatelli y cols., 1999; Weekers y cols., 2000). Estos ensayos se realizaron en preparaciones de corazón aislado sometido al daño por I/R *ex vivo*, provenientes incluso de animales con deficiencia en la secreción de la GH; los cuales demostraron que los GHRP ejercían acciones cardiotróficas directas que se manifestaban como una mejoría de la función sistólica y diastólica del miocardio. Los estudios realizados en pacientes con deficiencias en la liberación de la GH, por varias causas, también confirmaron las acciones cardiovasculares propias de los GHRP (Broglio y cols., 2001). Estos péptidos se han evaluado también en modelos *in vivo* de isquemia del miocardio y de MCD familiar (Tivesten y cols., 2000; Shen y cols., 2003b; Iwase y cols., 2004). En estos ensayos se demostró el papel de los GHRP en la prevención y reversión de la disfunción contráctil, principalmente. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen tras estos efectos cardiotróficos de los GHRP aún no están identificados completamente.

Las acciones de los GHRP en el miocardio han sido relacionadas, principalmente, con sus demostrados efectos tipo inotropo positivo, los cuales pueden favorecer la contractilidad del

músculo cardíaco (Xu y cols., 2003). Esto se ha corroborado incluso en humanos que recibieron administraciones únicas de los GHRP y de la ghrelina (Bisi y cols., 1999; Enomoto y cols., 2003). Sin embargo, la acción de inotropo positivo, que puede ser medida por ecocardiografía en términos del por ciento de fracción de eyección del ventrículo izquierdo, es de corta duración. En este sentido, no se conoce la relevancia de este efecto en los esquemas de administración prolongada de los GHRP, en términos de la cardioprotección ejercida. Por otro lado, en determinadas situaciones clínicas, tales como los primeros minutos posteriores a la isquemia, el incremento en la concentración intracelular de calcio forma parte de la fisiopatología del daño, y se ha demostrado que terapias con inhibidores de canales de calcio ejercen efectos citoprotectores (Erdogan y cols., 2001; Di Napoli y cols., 2002). Además, en los esquemas preconditionantes, donde los GHRP se han administrado de forma previa a la inducción del daño, el efecto inotropo positivo no está presente. Estos elementos indican la existencia de mecanismos alternativos asociados a los efectos cardioprotectores demostrados para los GHRP. Los estudios realizados en cultivos de cardiomiocitos demuestran la potencialidad de la ghrelina y los GHRP para inducir la transducción de señales que promueven la supervivencia celular (Baldanzi y cols., 2002; Pang y cols., 2004). Ensayos publicados en los últimos años demuestran la potencialidad del tratamiento con la ghrelina y los GHRP en el fallo cardíaco crónico, lo cual ha sido asociado a la disminución de la caquexia del músculo cardíaco y a la atenuación de la liberación de hormonas relacionadas con el estrés (Nagaya y cols., 2001; Nagaya y cols., 2004; Xu y cols., 2005).

Además de las actividades endocrinas y cardiovasculares de los GHRP, estas moléculas ejercen acciones de neuroprotección, mediadas fundamentalmente por la expresión de IGF-1 (Frago y cols., 2002; Paneda y cols., 2003; Frago y cols., 2005). Los restantes órganos y tejidos del organismo no han sido explorados como blancos potenciales de la acción citoprotectora de estos péptidos.

Los GHRP y la ghrelina poseen también efectos orexigénicos, interfieren a nivel central en el control del gasto de la energía, influyen en las secreciones pancreáticas, el metabolismo de los lípidos, el control de la motilidad gástrica y la secreción ácida (Broglio y cols., 2005). Estas moléculas inducen la proliferación de cardiomiocitos (Pettersson y cols., 2002), osteoblastos (Maccarinelli y cols., 2005), y neuronas (Johansson y cols., 2008); mientras que ejercen efectos antiproliferativos en algunas líneas cancerígenas (Ghe y cols., 2002; Cassoni y cols., 2006).

II.2 Especies Reactivas del Oxígeno y estrés oxidativo

II.2.1 Generalidades.

La homeostasis del estado redox celular consiste en mantener el balance entre la formación y eliminación de los mediadores oxidantes en la célula. Los radicales libres son especies químicas capaces de existir independientemente, y que poseen uno o más electrones desapareados en su último nivel. Esto les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, mediante reacciones de oxidación-reducción. Las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). Dentro de este grupo se incluyen también las Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN), aunque algunos autores se refieren a ellas de forma diferenciada (Halliwell, 2007).

La generación de ERO puede ocurrir en procesos fisiológicos tales como el envejecimiento (Kregel y Zhang, 2007) y la defensa antibacteriana (Babior, 2000). La sobreproducción de ERO, en cambio, ha sido vinculada con la patogenia de múltiples síndromes y enfermedades (McCord y Edeas, 2005), entre las que se destacan los episodios de I/R (Galaris y cols., 2006; Milei y cols., 2007). Igualmente, la toxicidad de muchos fármacos y agentes xenobióticos está mediada por la producción de ERO en las células (Natarajan y cols., 2006; Ichihara y cols., 2007).

II.2.2 Sistemas generadores de Especies Reactivas del Oxígeno.

Uno de los mecanismos endógenos más importante de producción de ERO es la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Anexo 2A). Durante la respiración celular, el oxígeno adquiere electrones de forma secuencial y se generan las siguientes ERO: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es un compuesto no radical libre pero de elevada reactividad, y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), que es la especie más reactiva (Fridovich, 1999).

El H_2O_2 se descompone muy lentamente en el radical HO^{\cdot} , de acuerdo a la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1985). Además, el radical $O_2^{\cdot-}$, a través de la reacción de Haber-Weiss, puede originar también al HO^{\cdot} (Koppenol, 2001). Ambas reacciones requieren la presencia de iones de metales de transición, Fe^{2+} y Cu^+ (Anexo 2B).

Existen otros mecanismos endógenos que producen ERO, como son el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos (Schrader y Fahimi, 2006), las reacciones del citocromo P450 (Gonzalez, 2005) y las reacciones de auto-oxidación de las catecolaminas (Anexo 2C), (Coyle y Puttfarcken, 1993). La activación de la fosfolipasa A2 dependiente de Ca^{2+} libera ácido araquidónico, sustrato de

lipooxigenasas y ciclooxigenasas, a partir del cual se generan eicosanoides y ERO (Anexo 2D), (Gaddi y cols., 2004).

Los neutrófilos son otra fuente importante de producción de ERO, principalmente el radical O_2^- y el H_2O_2 , mediado por el complejo enzimático NADPH-oxidasa que se encuentra unido a la membrana plasmática. Estas células poseen también la enzima Mieloperoxidasa (MPO), que en presencia de H_2O_2 y anión cloruro, cataliza la síntesis del ácido hipocloroso; potente agente oxidante y clorante (Whiteman y cols., 2003).

Durante la I/R de un órgano, la enzima Xantina Oxidasa (XO) es la principal fuente de radical superóxido. La Xantina Deshidrogenasa (XD), que es como se encuentra la enzima en los tejidos normoperfundidos, se convierte en XO durante la isquemia a través de la acción de proteasas dependientes del Ca^{2+} , o por la oxidación de grupos sulfhidrilos. En la reperfusión, la XO es capaz de transformar la hipoxantina, que se acumula por la degradación de las moléculas energéticas durante la isquemia, a radical superóxido y ácido úrico (Anexo 3). Esta enzima se ha detectado en las células endoteliales de muchos órganos como el hígado, el corazón, los pulmones y los riñones (Halliwell, 2007).

II.2.3 Sistemas generadores de Especies Reactivas del Nitrógeno.

El representante más relevante de las ERN es el radical óxido nítrico (NO). Su papel como mensajero molecular está ampliamente reconocido, así como también su participación en la vasodilatación, neurotransmisión y actividad antimicrobiana (Moncada y Higgs, 2006). La síntesis del NO se realiza a expensas de los átomos de nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina, mediada por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS), (Anexo 4A). Existen al menos tres isoformas de esta enzima, dos de las cuales se expresan de forma constitutiva en las neuronas y las células endoteliales. La tercera isoforma se expresa en los macrófagos luego de la estimulación por citocinas, lipopolisacáridos y otras moléculas relevantes de la respuesta inflamatoria (Yaylak y cols., 2007). El óxido nítrico reacciona con el radical superóxido originando el peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un fuerte agente oxidante y nitrante. Además, el peroxinitrito puede descomponerse y formar el radical $HO\cdot$, que es altamente tóxico (Anexo 4B), (Hogg y cols., 1992). La formación del $ONOO^-$ tiene lugar en las células vasculares y en los leucocitos, lo cual disminuye las propiedades de relajación vascular y de anti-agregación plaquetaria del NO (Villa y cols., 1994).

II.2.4 Daño celular inducido por las Especies Reactivas del Oxígeno.

Las ERO pueden provocar importantes alteraciones en los ácidos nucleicos, como consecuencia de la hidroxilación de sus bases nitrogenadas. Además, pueden producir inactivaciones enzimáticas, mediadas por la oxidación de grupos sulfhidrilos en las proteínas. Las enzimas con centros hierro-azufre son blancos directos para el superóxido. La reacción del H_2O_2 con los metales redox divalentes, es también importante en las oxidaciones biológicas de proteínas y lípidos que tienen lugar en los sitios de unión del metal. Igualmente, las ERO provocan daños severos a las membranas celulares, mediados por la oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados contenidos en los fosfolípidos. Este proceso de lipoperoxidación, producido preferentemente por el anión superóxido o por el radical hidroxilo, resulta en una reacción en cadena, ya que se forman radicales lipídicos intermediarios que son capaces de ampliar el efecto lesivo. La lipoperoxidación afecta la integridad de las membranas citoplasmáticas y la de organelos celulares importantes, como lisosomas y mitocondrias; lo cual compromete seriamente la función celular y puede inducir la muerte por apoptosis (Halliwell, 2007). Las ERO participan también en los eventos de transducción de señales, mediante la modificación oxidativa de diferentes quinasas, factores de transcripción y canales iónicos, lo que puede conducir también a la apoptosis de la célula (Afanas'ev, 2007).

II.2.5 Sistemas de defensa antioxidante.

Los antioxidantes son agentes endógenos o exógenos que pueden prevenir la acción de las ERO, y por tanto, disminuir la lesión en los tejidos (Halliwell, 2007). Estos pueden actuar eliminando directamente los radicales libres, en cuyo caso se les denomina secuestradores, o bloqueando la generación de éstos o sus efectos deletéreos. Los sistemas de defensa antioxidante se pueden clasificar, en función de su naturaleza catalítica, en enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasas (SOD) son metaloproteínas que dismutan el radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Anexo 5A). En las células eucariotas se encuentran tres tipos de SOD, con diferentes localizaciones: la SODCu/Zn citosólica, la SODMn mitocondrial, y la SODCu/Zn extracelular. La enzima antioxidante Catalasa se localiza predominantemente en los peroxisomas y en la membrana interna de la mitocondria, donde cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a agua (Anexo 5B). La enzima Glutación Peroxidasa (GPx) pertenece a una familia de seleno-enzimas citosólicas, que se complementa con la actividad de la Catalasa como sistemas reductores del peróxido de hidrógeno a agua. Por su parte, la enzima Glutación Reductasa (GRd) es una flavoenzima dependiente del NADPH, que cataliza la reducción

del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH); el cual será utilizado por la GPx para la reducción del H₂O₂ y de los lipoperóxidos (Anexo 5C), (Blokhina y cols., 2003). Uno de los principales sistemas antioxidantes no enzimáticos y endógenos es precisamente el GSH, que es capaz de eliminar por sí mismo muchas ERO, incluyendo el radical hidroxilo (Mytilineou y cols., 2002). Las vitaminas C, E (Kojo, 2004; Singh y cols., 2005) y los micronutrientes (Evans y Halliwell, 2001) son también importantes antioxidantes suplementados de manera exógena.

II.3 Fisiopatología del daño inducido por la Isquemia/Reperfusión en los tejidos

II.3.1 Generalidades.

La lesión de I/R se define como el daño que sufre un órgano o tejido sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo arterial, fase de isquemia, y que posteriormente es reperfundido con sangre oxigenada, fase de reperfusión. Numerosos estudios experimentales han proporcionado pruebas convincentes de que la reperfusión, si bien es esencial para la supervivencia del tejido, es capaz por sí misma de producir un daño adicional (Fondevila y cols., 2003; Hoffman, Jr. y cols., 2004). De esta forma, el daño por reperfusión puede definirse como la afectación causada por la reinstauración del flujo sanguíneo, capaz de producir la muerte de células que solo fueron dañadas de manera reversible durante el período de isquemia previo (Yellon y Hausenloy, 2007).

Cada órgano o tejido tiene una sensibilidad y resistencia distinta ante la pérdida total o parcial de su flujo sanguíneo. Existen dos formas principales de isquemia. La *Isquemia Fría* es la que se desarrolla durante la realización de un trasplante, en el período de tiempo en que el órgano se encuentra fuera del organismo, a una temperatura de 4°C. Por su parte, la *Isquemia Caliente* es la que sucede con la interrupción del flujo sanguíneo al órgano, manteniendo éste la misma temperatura que tiene habitualmente en el organismo (Arii y cols., 2003). Esta última es más común en la clínica, tanto en procedimientos quirúrgicos como en accidentes vasculares oclusivos.

II.3.2 Alteraciones celulares durante la Isquemia/Reperfusión.

El fenómeno de I/R es una secuencia compleja de sucesos trascendentales: la alteración metabólica celular que aparece durante el período de isquemia, y la lesión producida por las ERO y otros factores, que involucran al endotelio vascular y los polimorfonucleares, durante la fase de reperfusión (Girn y cols., 2007).

Durante el período de isquemia, la falta de oxígeno a la célula inhibe la fosforilación oxidativa en la mitocondria. La escasa formación de ATP paraliza todas las funciones celulares que requieren energía y se comienza a consumir el ATP existente, siendo éste un mecanismo que emplea la célula

para mantener su homeostasis. El ATP se hidroliza a ADP y AMP, y este último se cataboliza a hipoxantina, la cual se va acumulando en la célula mientras dure la isquemia. Como se explicó anteriormente (Anexo 3), este proceso será de gran importancia en la lesión que se producirá durante la reperfusión. Asimismo, se estimula la glucólisis anaerobia que genera ácido láctico e hidrogeniones, los que disminuyen el pH y provocan aumento de la osmolaridad, causando edema intracelular. La acidosis citosólica activa también a las enzimas de los lisosomas, lo que puede conducir a la autólisis y muerte celular.

La depleción de los depósitos de energía implica un trastorno en los gradientes transmembrana ya que se inhibe la actividad de la bomba Na-K-ATPasa, encargada de mantener el equilibrio iónico entre la célula y el espacio intersticial. De este modo queda abolido el potencial de membrana y los iones sodio penetran a la célula incontroladamente, arrastrando consigo un gran volumen de agua. Ello conduce también a la aparición de edema celular y a diferentes alteraciones citoplasmáticas (autólisis de lisosomas, dilatación del retículo endoplasmático), que pueden provocar la muerte de la célula. Como consecuencia del incremento intracelular de sodio, se produce también un aumento de la concentración del calcio citoplasmático que activa diferentes sistemas enzimáticos como fosfolipasas, proteasas, ATPasas y endonucleasas; las que inician importantes cascadas de señalización intracelular, mediadoras del daño al tejido. Los cambios celulares antes citados aún pueden ser reversibles, en dependencia del tiempo de isquemia, siempre y cuando se reestablezca el aporte de oxígeno a la célula. Si esto último no sucede, comienza la salida de diferentes enzimas al citoplasma que provocan la digestión celular. Consecuentemente, se inicia la degradación de los fosfolípidos de membrana, lo que conduce inevitablemente a la muerte de la célula (Teoh y Farrell, 2003; Yellon y Hausenloy, 2007).

Durante la reperfusión, proceso imprescindible para la viabilidad del órgano, se recupera la disponibilidad de oxígeno y el nivel energético en las células. Es precisamente con la llegada del flujo sanguíneo cargado de oxígeno que se originan las ERO, principales mediadores de la lesión inducida por la I/R en los tejidos (Jaeschke, 2003; Neuzil y cols., 2005). Estos agentes oxidantes, unidos a la liberación de citocinas proinflamatorias, provocan la disfunción del endotelio vascular (Cooper y cols., 2002). Este proceso se caracteriza por el incremento en la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales sinusoidales, que de forma conjunta a la disminución de la liberación de óxido nítrico, promueven y facilitan la infiltración de los polimorfonucleares, que llegan durante la reperfusión, al interior del tejido dañado (Thomas y cols., 2003). Los neutrófilos

así infiltrados van a contribuir a la progresión y severidad del daño mediante la liberación de agentes nocivos como las ERO y proteasas, principalmente catepsina y elastasa, que amplifican el daño al tejido (Kaminski y cols., 2002; Vinten-Johansen, 2004).

Aunque la concentración de calcio intracelular ya se encontraba elevada durante la isquemia, la actividad de ciertas enzimas como la calpaína puede aumentar considerablemente durante la reperfusión, debido a la corrección de la acidosis intracelular. Estas proteasas actúan sobre proteínas estructurales, contribuyendo a la muerte celular (Neuhof y cols., 2004; Mehendale y Limaye, 2005). Las mitocondrias también pueden captar calcio durante la reperfusión, lo cual puede tener consecuencias letales para la célula ya que puede inducir la apertura del Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PTPM) (Hausenloy y cols., 2003). Esto da lugar a la despolarización de la mitocondria, la pérdida del gradiente de H^+ y la disminución de la síntesis de ATP. Cuando esto ocurre en una fracción importante de las mitocondrias, se produce la muerte de la célula por necrosis (Solaini y Harris, 2005). Además, la apertura del PTPM está relacionada con la activación de rutas de señalización desencadenantes de la apoptosis de la célula (Morin y cols., 2004).

II.3.3 Particularidades del daño por Isquemia/Reperfusión del miocardio.

Se denomina infarto del miocardio a la muerte celular de las miofibrillas en una zona del corazón, causada por la oclusión de la arteria que irriga dicho territorio (Braunwald E, 2005). Las estadísticas indican que aproximadamente cada 26 segundos una persona sufre un IMA, y que a cada minuto se produce una muerte por infarto cardiaco, en el mundo. Solamente en los EE.UU., aproximadamente 1,5 millones de nuevos casos de IMA ocurren cada año (Rosamond y cols., 2008).

Las consecuencias de un período de isquemia miocárdica transitoria pueden abarcar desde trastornos funcionales reversibles, como son fallo de la función contráctil (atontamiento) y arritmias; hasta la muerte celular masiva (Braunwald E, 2005). Aunque estas alteraciones funcionales transitorias son de gran importancia clínica, la necrosis es la manifestación más relevante de la I/R miocárdica, y su extensión constituye el principal factor determinante de la supervivencia y calidad de vida en aquellos pacientes que han sufrido un IMA (Brodie y cols., 2007; Piot y cols., 2008).

Aproximadamente el 90% de los IMA resultan de una trombosis aguda que obstruye la arteria coronaria aterosclerótica (Antman y cols., 2008). El restablecimiento del flujo sanguíneo es indispensable para limitar la muerte del miocardio sometido a una oclusión coronaria, y es el objetivo primario a conseguir, ya sea siguiendo un tratamiento trombolítico o mediante técnicas

percutáneas de intervención intracoronaria (Keeley y cols., 2006; White y Chew, 2008). Aunque la reperfusión tiene siempre un efecto beneficioso sobre el tamaño de la necrosis y sobre la función del ventrículo izquierdo, mayor o menor dependiendo del momento en que se aplique, este beneficio está atenuado por la ocurrencia del llamado daño letal por reperfusión (Yellon y Hausenloy, 2007).

La re-energización mitocondrial en las células cardiacas y endoteliales es la principal fuente de ERO durante la reperfusión del miocardio. La llegada del oxígeno molecular a la mitocondria ocurre a pesar de que muchas de ellas se encuentran severamente afectadas como consecuencia de la isquemia, por lo que no se reduce adecuadamente el oxígeno molecular a agua, y en su lugar se forman ERO (Zorov y cols., 2006; Makazan y cols., 2007). Otras fuentes importantes de formación de ERO durante la reperfusión miocárdica son las células endoteliales, a través de la enzima XO principalmente, y la enzima NADPH-oxidasa de los neutrófilos infiltrados (Byrne y cols., 2003; Vinten-Johansen, 2004).

La tolerancia del miocardio a la I/R es muy pobre comparada con la de otros tejidos, y períodos muy cortos de isquemia, menores incluso de 60 minutos, pueden resultar en una necrosis celular masiva (Vetterlein y cols., 2003). Los miocitos están provistos de una maquinaria contráctil muy potente y se encuentran interconectados firmemente entre sí, para asegurar el acoplamiento eléctrico y mecánico durante su normal funcionamiento. Estas características específicas los hacen particularmente susceptibles a un tipo de daño celular que no afecta a otros tejidos, el daño mecánico por reperfusión. Esta forma de daño está mediada principalmente por el fenómeno de hipercontractura, que consiste en un acortamiento brusco de la longitud celular debido a una activación exagerada de la maquinaria contráctil (Ladilov y cols., 2003). La hipercontractura se produce en los primeros minutos de la reperfusión, cuando se logra la recuperación energética de la célula y la normalización del pH, en presencia de elevadas concentraciones de calcio en el citosol (Lemasters y cols., 1996). Esta contractura exagerada provoca una sobrecarga mecánica que excede la capacidad elástica del sarcómero y del citoesqueleto, lo cual destruye la arquitectura celular y rompe el sarcolema, ocasionando así la muerte de las células; más específicamente, el llamado cuadro histológico de necrosis en bandas de contracción (Rodríguez-Sinovas y cols., 2007). Se ha demostrado que las ERO pueden contribuir directamente al daño mecánico por reperfusión, ya que pueden aumentar la fragilidad del sarcolema y de la maquinaria contráctil mediante modificaciones redox de sus proteínas (Ferrari y cols., 2004).

Otra de las particularidades del músculo cardiaco durante el daño por I/R es la presencia de arritmias, las que pueden ser variables en cuanto a su severidad, abarcando desde extrasístoles ventriculares hasta la fibrilación ventricular. Las alteraciones iónicas que se producen durante la fase de isquemia se han relacionado con la disfunción contráctil y la aparición de las arritmias en esta fase (Carmeliet, 1999). Se ha demostrado además que los mecanismos que contribuyen al desarrollo de la hipercontractura son igualmente responsables de la génesis de arritmias asociadas a los primeros minutos de la reperfusión (del Monte y cols., 2004; Lakireddy y cols., 2006). La presencia de ERO ha sido también vinculada con la génesis de las arritmias durante la reperfusión (Ravingerova y cols., 1999), y se han evaluado diversos agentes antioxidantes como potenciales antiarrítmicos (Vianna y cols., 2006; Hicks y cols., 2007).

II.3.4 Particularidades del daño por Isquemia/Reperfusión del hígado.

La inducción de un episodio de I/R hepática es un paso obligatorio en numerosos procedimientos quirúrgicos, entre los que se destaca el trasplante hepático. Esta forma de daño también se produce como parte de la fisiopatología de enfermedades sistémicas, por ejemplo los estados de shock. En cualquier caso, períodos superiores a los 60 minutos de isquemia hepática son capaces de producir pérdidas en la viabilidad y en la función del órgano (Weinbroum y cols., 1999). La prevención y corrección de las alteraciones funcionales hepáticas es fundamental para la supervivencia del paciente. La disfunción primaria del injerto que se produce como resultado de la I/R, es actualmente el principal factor limitante para el éxito de la cirugía de trasplante en el mundo (Barber y cols., 2007).

En el caso de la I/R hepática, la enzima XO de las células endoteliales es la mayor fuente de radicales superóxido (Arii y cols., 2003). Las células de Kupffer, macrófagos residentes del hígado, juegan también un papel muy importante en el daño por I/R (Jung y Lee, 2005). Estas células al activarse liberan ERO, óxido nítrico y proteasas que amplifican el daño tisular.

Por otro lado, la disminución de forma aguda o crónica de la perfusión sanguínea al hígado, induce lesiones en tejidos extra-hepáticos, las que pueden conducir a un síndrome de Disfunción o Daño Múltiple de Órganos (DMO) (Spapen, 2008). La disfunción múltiple es el término que define el derrumbe progresivo de las funciones de varios órganos del organismo. El daño por su parte es el cambio morfológico que sustenta el fracaso de la función (Chalenko, 1998). Esta entidad constituye la primera causa de muerte en pacientes sometidos a cuidados intensivos, y provoca hasta un 80% de mortalidad (Hartl y cols., 2006). El DMO se relaciona con la producción y liberación al torrente

sanguíneo de forma incontrolada, por parte del tejido hepático lesionado, de mediadores pro-inflamatorios que inducen un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS). Entre los mediadores inflamatorios de este síndrome se incluyen las interleucinas 1, 6, 8 (IL-1, IL-6, IL-8), y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α); liberados fundamentalmente por las células de Kupffer y los neutrófilos infiltrados en el hígado (Kimura y cols., 2006; Jiang y cols., 2007). Se ha demostrado también la participación de las ERO en la génesis del DMO instaurado durante la reperfusión del tejido hepático (Weinbroum y cols., 1999).

II.4 Miocardiopatía Dilatada

II.4.1 Generalidades.

La Miocardiopatía Dilatada (MCD) se caracteriza por la dilatación del ventrículo izquierdo o de los dos ventrículos, el afinamiento de las paredes del músculo cardiaco, y una marcada disminución de la función contráctil (Towbin y Bowles, 2006). Esta enfermedad es una de las formas clínico-patológicas más frecuentes del músculo cardiaco, con una prevalencia mundial de 1:2500 (Rosamond y cols., 2008). La MCD constituye la tercera causa más común de Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC), el diagnóstico más frecuente en pacientes tributarios de un trasplante del miocardio, así como uno de los principales elementos contribuyentes al episodio de muerte súbita por fibrilación ventricular (Brembilla-Perrot, 2007; Hiramitsu y cols., 2007). Esta es una enfermedad de mal pronóstico, en tanto que del 30 al 50% de los pacientes no superan los 5 años de vida luego de establecido el diagnóstico (Cutler y cols., 2006).

Existen diferentes tipos de MCD en dependencia del daño inicial al músculo cardiaco. En este sentido la enfermedad se clasifica en: idiopática, genética/familiar, viral y/o inmune, alcohólica/tóxica, o asociada a otras cardiopatías como la isquemia y la hipertensión. Por tal motivo se plantea que la MCD es la forma de expresión “común” del daño producido por diversas agresiones al miocardio (Schultheiss y cols., 2005).

II.4.2 Miocardiopatía Dilatada inducida por la Doxorubicina.

Entre los múltiples agentes nocivos que pueden inducir una MCD tóxica se encuentran las antraciclinas (Drimal y cols., 2006; Takemura y Fujiwara, 2007). Estos fármacos antineoplásicos tienen un alto impacto clínico (Ganem y cols., 2003; Saeki y cols., 2006). Sin embargo, su uso está limitado principalmente por su cardiotoxicidad, la cual debuta en más del 20% de los pacientes sometidos a quimioterapia, con una mortalidad del 50% a los dos años (Jensen y cols., 2002). La aparición de la enfermedad puede ser de forma aguda (durante la administración del fármaco),

precoz (días a meses después de la administración), o tardía (meses y hasta años después) (Petit, 2004). Otros efectos adversos importantes que se describen para los tratamientos quimioterapéuticos es su hepatotoxicidad, que puede conducir a cirrosis del hígado, además de la mielosupresión y la mucositis (Llesuy y Arnaiz, 1990; Payne y cols., 2006).

El curso clínico de la MCD inducida por antraciclinas es insidioso, progresivo, generalmente irreversible, y resistente a la terapia (Minotti y cols., 2004). Como consecuencia, los pacientes sometidos a quimioterapia pueden evolucionar a una ICC de alto riesgo para su vida. Cuanto mayor sea la dosis de antraciclina administrada, mayor es la probabilidad de aparición de la MCD. La determinación del nivel de dosis máxima de antraciclina a administrar en los pacientes con cáncer puede producir Insuficiencia Cardíaca en algunos, y privar a otros de continuar con un tratamiento útil y necesario para su enfermedad (Hortobagyi, 1997).

La Doxorubicina (DX) es un antibiótico antitumoral del grupo de las antraciclinas, ampliamente utilizado contra el cáncer, dada su efectividad en el tratamiento de tumores tanto sólidos como hematológicos (Malhotra y cols., 2004; Bjarnason y cols., 2005). La cardiotoxicidad de este fármaco está mediada primordialmente por la generación de ERO durante su metabolismo intracelular (Zhou y cols., 2001; Takemura y Fujiwara, 2007). La DX reacciona con la citocromo P450 reductasa, en presencia de NADPH, para formar radicales intermediarios de semiquinona (Bartoszek, 2002). Además, la DX posee una habilidad marcada para formar un complejo estable con el hierro férrico (Fiallo y cols., 1999), en el cual se favorece la reducción de éste a hierro ferroso, generándose también el radical libre de semiquinona (Myers, 1998). Estos radicales libres, formados de forma enzimática o no a partir de la estructura de semiquinona de la DX, pueden reaccionar rápidamente con el oxígeno para producir el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas ERO causan la peroxidación de los lípidos de membrana y otros componentes celulares (Bagchi y cols., 1995), inhiben la respiración celular, por daño a los componentes de la cadena de fosforilación oxidativa y a la membrana de la mitocondria (Ohkura y cols., 2003), además de dañar el ADN por oxidación de sus bases (Monti y cols., 1995). A esto se adiciona que, la administración de la DX disminuye los antioxidantes intracelulares en el miocardio (Li y Singal, 2000), lo cual agrava el cuadro de cardiotoxicidad por estrés oxidativo. Todos estos mecanismos promueven la muerte celular por apoptosis de los cardiomiocitos (Arola y cols., 2000). La DX también induce alteraciones en el gradiente de calcio en el corazón, al alterar la sensibilidad del canal de rianodina (Saeki y cols., 2002). Recientemente se demostró que la generación de ERO a

partir de la DX induce alteraciones en el ADN mitocondrial (Lebrecht y cols., 2005). Esto promueve una disfunción de la cadena respiratoria que se acumula en el tiempo, aún en ausencia de la administración continua de la DX. Tal descubrimiento implica también la participación del estrés oxidativo en la patogenia de la MCD tardía en su inicio. La secuencia de daños ocasionados por la DX al cardiomiocito se inicia con la dilatación de los sarcotúbulos y la vacuolización del citoplasma y las mitocondrias. La inducción de los mecanismos de muerte celular programada se refleja histológicamente en la pérdida del grosor y número de los miocitos contráctiles (Wutzen y cols., 1986; Anjo y cols., 1991).

Se han ensayado diferentes métodos para minimizar la cardiotoxicidad de las antraciclinas. Las investigaciones más recientes se enfocan en el desarrollo de nuevas formulaciones de la DX, con los mismos efectos antitumorales, pero con menor toxicidad cardíaca. Entre estas opciones se destacan la asociación de las antraciclinas a otras moléculas, por ejemplo, complejos liposomales (El Rayes y cols., 2005) y la pegilación (Ferrero y cols., 2007), en un intento de establecer un mecanismo de liberación lenta del fármaco. La administración concomitante de agentes cardioprotectores es otra de las estrategias empleadas actualmente para prevenir la MCD por antraciclinas. Entre los agentes antioxidantes que han demostrado efectividad en modelos animales se encuentran la vitamina E (Bjelogrljic y cols., 2005) y el probucol (El Demerdash y cols., 2003). Otros investigadores mostraron una marcada protección en las mitocondrias de los cardiomiocitos con el aumento de la actividad de la SODCu/Zn, lo cual incrementó la relación de las proteínas Bcl-2/Bax como indicativo de la atenuación de la apoptosis (Abou El Hassan y cols., 2003). Existe una mayor experiencia clínica con los agentes quelantes del hierro que disminuyen la generación de ERO inducida por las antraciclinas, pero su uso clínico no es aceptado a plenitud (Buss y cols., 2004; Xu y cols., 2008).

II.5 Cirrosis Hepática

II.5.1 Generalidades.

Las enfermedades crónicas del hígado constituyen un grave problema de salud a nivel mundial (Bosetti y cols., 2007). La cirrosis hepática es la novena causa de mortalidad en los EE.UU., donde es responsable de aproximadamente 35 000 muertes cada año. Las autoridades sanitarias esperan que el número mundial de casos de cirrosis se incremente de manera continua hasta el año 2050 (Mendez-Sanchez y cols., 2007).

La cirrosis representa el estadio final de varias enfermedades crónicas del hígado de diversa etiología, entre las cuales las más frecuentes son las hepatitis por abuso del consumo de alcohol, o por infección crónica con los virus de la hepatitis B o C (Friedman, 2003). La enfermedad se puede clasificar en compensada o descompensada, en dependencia de que se manifiesten o no alguno de los posibles signos clínicos. Las principales complicaciones de la cirrosis incluyen la ascitis, el fallo renal, la encefalopatía hepática y las varices gastroesofágicas. La cirrosis descompensada se asocia con una sobrevivida muy corta del paciente, y la única terapia efectiva actualmente es el trasplante hepático (Schuppan y Afdhal, 2008).

La fibrosis avanzada y la cirrosis eran generalmente consideradas condiciones irreversibles, aún después de eliminar el agente nocivo. Sin embargo, las evidencias recientes obtenidas a partir de modelos animales y pacientes indican que, incluso la cirrosis avanzada puede ser reversible (Hammel y cols., 2001; Arthur, 2002; Issa y cols., 2004). Esto ha provocado un aumento considerable en el número de investigaciones en busca de nuevas terapias antifibróticas. Numerosos agentes han mostrado efectividad a nivel preclínico en la remoción del tejido fibrótico (Liu y cols., 2006; Di Sario y cols., 2007; El Demerdash y cols., 2008). Sin embargo, actualmente, la terapia más efectiva que existe en la clínica para inducir la regresión de la fibrosis es remover el agente causal (Friedman, 2007). Por tanto, todos los esfuerzos que se inviertan en el desarrollo de nuevas terapias antifibróticas están justificados.

II.5.2 Fisiopatología de la fibrosis hepática.

La fibrosis hepática es el resultado de la respuesta de cicatrización del hígado ante un daño ejercido de forma crónica (Friedman, 2003). Después de un daño agudo al hígado, por ejemplo las hepatitis virales, las células del parénquima hepático se regeneran y reemplazan a las células necróticas o apoptóticas. Este proceso está asociado con una respuesta inflamatoria y un limitado depósito de matriz extracelular (MEC). Si el daño al hígado persiste, el proceso de regeneración hepatocitaria falla y los hepatocitos son sustituidos por abundante MEC, incluyendo los colágenos fibrilares. Con el avance de la enfermedad se distorsiona la arquitectura hepática, al formarse puentes intervasculares de cordones fibróticos que conforman los llamados nódulos cirróticos. Es por esto que la Organización Mundial de la Salud define la cirrosis hepática como un proceso caracterizado por la conversión de la arquitectura normal del hígado en nódulos estructuralmente anómalos (Anthony y cols., 1977). La formación de estos nódulos induce la disfunción hepatocelular e

incrementa la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo, lo cual resulta en insuficiencia hepática e hipertensión portal, respectivamente (Gines y cols., 2004).

Las células estrelladas hepáticas (CEH) son las principales productoras de los colágenos y otras proteínas de MEC que se depositan en la fibrosis (Gressner y Weiskirchen, 2006). En condiciones normales, estas células constituyen los principales sitios de almacenamiento de vitamina A y grasa, entre otras funciones fisiológicas. Sin embargo, como resultado del daño crónico en el hígado, las CEH se activan o transdiferencian a miofibroblastos y adquieren propiedades contráctiles, proinflamatorias y fibrogénicas. Una vez activadas, las CEH migran y se acumulan en los sitios de reparación del tejido, donde secretan grandes cantidades de MEC y regulan la degradación de la misma (Moreira, 2007). Este proceso de activación y transdiferenciación de las CEH se produce como resultado de interacciones con células residentes (hepatocitos y células de Kupffer), y no residentes (infiltrado inflamatorio) en el hígado, las que se encuentran activadas como consecuencia del daño primario inducido a los hepatocitos (Saile y Ramadori, 2007). Entre los mediadores circulantes de estas interacciones se encuentran las ERO, producidas por las células de Kupffer (Kawada y Otagawa, 2007), la enzima NADPH oxidasa de las CEH (De Minicis y Brenner, 2007), la ruta del citocromo P4502E1 de los hepatocitos durante el metabolismo del etanol (Siegmund y Brenner, 2005) y los monocitos que son atraídos al sitio del daño (Kershenobich y Weissbrod, 2003). Igualmente, el daño a los hepatocitos induce la liberación de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento profibrogénicos, principalmente el TGF- β , el CTGF y el PDGF (Gressner y Weiskirchen, 2006). Todos estos mediadores circulantes ejercen acciones citotóxicas directas que contribuyen al daño al parénquima, atraen y activan células monocíticas que amplifican el daño al tejido, y promueven directamente la transdiferenciación fenotípica y proliferación de las CEH (Gabele y cols., 2003).

II.5.3 Modelo de daño hepático inducido por tetracloruro de carbono.

El modelo de hepatotoxicidad aguda o crónica con Tetracloruro de Carbono (CCL₄) es uno de los más utilizados para estudiar el papel de los radicales libres en el daño hepático (Poli, 1993). La hepatotoxicidad del CCL₄ se debe a la formación del radical triclorometil (CCL₃·), por ruptura homolítica, a nivel del microsoma hepático y con la participación del sistema citocromo P450. Este radical reacciona rápidamente con el oxígeno, originando el radical triclorometilperoxil (CCL₃O₂·), el cual inicia el proceso de daño celular oxidativo a través de la peroxidación de los lípidos poli-insaturados de la membrana citoplasmática y de los organelos celulares. Además del daño oxidativo,

estos productos derivados del metabolismo del CCL₄ se unen covalentemente a los organelos celulares de los hepatocitos, lo que trae como consecuencia la afectación de los procesos de síntesis, maduración, transporte y liberación de las lipoproteínas hepáticas; incluso en presencia de agentes antioxidantes como la vitamina E (Becker y cols., 1987). Estas alteraciones producen una acumulación anormal de lípidos, que se relaciona con el fenotipo de hígado graso observado desde las primeras dosis administradas del CCL₄ (Barisione y cols., 1993). Igualmente, las ERO inducidas por el CCL₄ provocan apoptosis y/o necrosis de los hepatocitos, y contribuyen a la respuesta inflamatoria orquestada por las células de Kupffer y los neutrófilos infiltrados (Natarajan y cols., 2006). La repetición de ciclos de daño, inflamación y reparación, provocados por la administración continua de CCL₄, resulta en la fibrosis del hígado.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño experimental de la tesis

En este trabajo de tesis se emplearon cuatro modelos animales, dos de enfermedades cardiovasculares y dos de patologías del hígado (Tabla 1). Para ambos órganos se desarrollaron modelos de daño agudo por I/R que fueron inducidos quirúrgicamente. Los modelos animales de las enfermedades crónicas estudiadas, la MCD y la cirrosis, se obtuvieron mediante la administración de agentes tóxicos validados en la literatura internacional. En cada estudio se realizaron evaluaciones específicas para demostrar la efectividad del tratamiento aplicado. Además se emplearon evaluaciones comunes en los cuatro estudios, que permitieron detectar la afectación de los tejidos así como explorar algunos elementos del mecanismo citoprotector del péptido GHRP6.

Tabla 1. Diseño experimental de la tesis.

Modelo Experimental	Especie animal	Inducción de la enfermedad	Tipo de Daño	Evaluaciones Específicas	Evaluaciones Comunes
Modelo de IMA	Cerdos	Método Quirúrgico	Agudo	Talla del IMA Estudios eléctricos	Estudios histológicos.
Modelo de MCD	Ratas	Agente Químico	Crónico	Ecocardiografía Estudio por MET	Medición de parámetros bioquímicos indicadores del daño tisular.
Modelo de I/R Hepática y DMO	Ratas	Método Quirúrgico	Agudo	Indicadores del infiltrado inflamatorio	Evaluación de parámetros indicadores del estrés oxidativo.
Modelo de Cirrosis Hepática	Ratas	Agente Químico	Crónico	Ultrasonido hepático Estudio por MET Inmunohistoquímica	Medición de la expresión transcripcional de genes.

III.2 Reactivos

III.2.1 Sustancias químicas administradas a los animales.

El péptido GHRP6 se sintetizó en los laboratorios Lipotec SA (Barcelona, España). La molécula se almacenó a -20°C, protegida de la luz, hasta el momento de ser diluida y administrada a los animales. Este hexapéptido es soluble en Solución Salina Fisiológica (SSF), la cual se utilizó como placebo. La DX se adquirió en forma de una solución inyectable, a una concentración de 2 mg/mL, de la firma Lemery (México). El CCL₄ empleado se adquirió de la firma MERCK (Alemania).

III.3 Animales de experimentación

Los cerdos, de la raza ibérica (rústicos-criollos negros), machos, de aproximadamente 4 meses de edad y en un rango de 23 a 29 Kg de p.c; se adquirieron en el Centro Nacional de Genética Porcina de La Habana (Cuba). Las ratas, de la línea *Wistar*, machos, de 9 a 10 semanas de edad y de 200 a 250 g de p.c; se adquirieron en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (Cuba). Estos animales se mantuvieron y manipularon en concordancia con la “*Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*” (Bayne, 1998). No existieron especificaciones de agua, comida o condiciones de alojamiento para los animales, en ninguno de los ensayos realizados. Solamente 24 horas antes del acto quirúrgico, se retiró la alimentación.

III.4 Procesamiento de las muestras

III.4.1 Muestras para evaluación histológica.

Las muestras de tejidos colectadas para estudios histopatológicos se fijaron en solución de formol al 10% y se embebieron en parafina. Posteriormente, empleando un micrótopo (Leika, Alemania) se obtuvieron cortes semifinos (2-3 micras) que fueron teñidos con hematoxilina/eosina. Todas las evaluaciones histológicas se realizaron a ciegas y por al menos dos investigadores, incluyendo los estudios de histomorfometría.

III.4.2 Muestras para evaluación por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Los fragmentos de tejidos colectados para los estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) se fijaron en glutaraldehído al 3,2% y se post-fijaron en tetróxido de osmio al 1%, a 4°C y por 60 minutos, en ambos casos. Posteriormente, las muestras se lavaron con una solución de PBS (0,1M; pH 7,2) y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, a una temperatura de 4°C. La inclusión se realizó según lo reportado en la literatura (Spurr, 1969). Las secciones ultrafinas obtenidas con un ultramicrótopo (NOVA, LKB, Alemania), de 400-500Å de grosor; se colocaron sobre rejillas de cobre y níquel de 400 orificios, se contrastaron con acetato de uranil saturado y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio JEOL JEM 2000 EX (JEOL, Japón).

III.4.3 Muestras de suero para evaluaciones bioquímicas.

Las muestras de sangre colectadas se incubaron a 4°C por dos horas y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos (Centrifuga Hitachi, Japón); lográndose así la retracción efectiva del coágulo. El suero obtenido se almacenó en alícuotas a -20°C hasta el momento de ser procesado. Las determinaciones en suero de ALAT, ASAT, creatinina, colesterol, triglicéridos,

VLDL, albúmina y proteínas totales, se realizaron en un analizador automático (Hitachi 747, Alemania); empleando en cada caso las técnicas y estuches comerciales que especifican las instrucciones de los fabricantes.

III.4.4 Muestras para evaluar parámetros indicadores del estrés oxidativo.

La evaluación de los parámetros del estrés oxidativo se realizó tanto en muestras de suero como en muestras de tejidos. Para ello, los fragmentos de órganos se homogenizaron en una solución tampón (KCl 50mM-Histidina 5mM; pH 7,4) en proporción 1:10, por 3 minutos, a 15 000 rpm y a 4°C; utilizando un homogenizador de tejidos ULTRA-TURRAX T8 (IKA LABORTECHNIK, Alemania). Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 5 000 rpm durante 20 minutos a 4°C (Centrifuga 5415R, Eppendorf, EE.UU.). Los sobrenadantes colectados se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta su procesamiento.

Todos los parámetros del estrés oxidativo se determinaron utilizando un espectrofotómetro de luz UV/visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, EE.UU.). La cuantificación del contenido de hidroperóxidos totales (HPT) y malondialdehído (MDA) se realizó empleando los estuches comerciales Bioxytech H₂O₂-560 y Bioxytech LPO-586 (OXIS International Inc., EE.UU.), respectivamente, siguiendo en ambos casos las instrucciones de los fabricantes. La actividad total de la SOD se evaluó por el método basado en la autooxidación del pirogallol en medio básico, donde se generan radicales superóxido que propagan la reacción radicalaria. La forma oxidada del pirogallol absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un sequestrador de radical superóxido como la enzima SOD inhibe la autooxidación. Se toma como 1U de SOD, la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de autooxidación del pirogallol a 25°C. La enzima Catalasa se determinó siguiendo la descomposición del H₂O₂ a 240 nm, en intervalos de 10 segundos, durante un minuto (Ajamieh y cols., 2002). Estos parámetros bioquímicos evaluados en los tejidos se ajustaron a la concentración total de proteínas, la cual se determinó utilizando el estuche comercial Protein dye Kit (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.).

III.4.5 Muestras para evaluar la expresión transcripcional de genes por la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Los fragmentos de tejidos colectados para evaluar la expresión transcripcional de genes se almacenaron rápidamente en nitrógeno líquido hasta ser procesados. La purificación del ARN total se realizó mediante tratamiento con Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, EE.UU.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La calidad y cantidad del ARN purificado se estimó mediante la

determinación de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, unido a la visualización por electroforesis de las dos bandas del ARN ribosomal. El ADN genómico contaminante se eliminó mediante digestión con la enzima ADNasaI (Epicentre Technologie, EE.UU.), libre de actividad ARNasa, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Una cantidad de 1 µg del ARN tratado previamente con la ADNasaI se utilizó para la técnica de RT-PCR, empleando el estuche comercial GeneAmp RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, EE.UU.), de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes. La amplificación de los genes de interés se realizó utilizando los pares de oligonucleótidos y temperaturas especificadas en el Anexo 6. El gen de expresión constante β-actina se empleó en todos los casos para normalizar la expresión de los genes evaluados. Las bandas obtenidas se detectaron aplicando 1/10 ó 1/5 del volumen de la reacción de amplificación en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Kodak ID 3,6 (Kodak, EE.UU.).

III.5 Evaluación de los efectos del GHRP6 en modelos experimentales de enfermedades cardiovasculares

III.5.1 Modelo experimental de IMA en cerdos.

- ***Protocolo de inducción del IMA.***

Los animales se anestesiaron por vía endovenosa (Anexo 7A), empleando una mezcla de ketamina (16 mg/Kg de p.c), flunitrazepam (0,45 mg/Kg de p.c) y pavulon (0,03 mg/Kg de p.c). Se utilizó el succinilcolina (1 mg/Kg de p.c) como relajante muscular. Los cerdos anestesiados se entubaron con un traqueo-tubo de 7 mm (PORTEX, Inglaterra) y se ventilaron con oxígeno medicinal, a razón de 800 mL/minuto/Kg de p.c, a una frecuencia de 24 respiraciones/minuto y a una presión de 15 cm de agua; empleando una máquina de ventilación mecánica Mark 8 (BIRD, California, EE.UU.), (Anexo 7B). El monitoreo electrocardiográfico del estudio se realizó empleando un equipo CYS-SG (Instituto Central de Investigaciones Digitales-ICID; Cuba), (Anexo 7C). Utilizando el programa CARDIOCID-PC (EICISOFT, ICID; Cuba), se obtuvieron los registros de las 12 derivaciones del ECG y de la frecuencia cardiaca, cada 20 segundos, durante el acto quirúrgico y la primera hora del período de reperfusión. El procedimiento quirúrgico para la inducción del IMA fue efectuado como sigue. Se colocó al cerdo en decúbito lateral derecho y se realizó una toracotomía entre los espacios intercostales cuarto y quinto, hasta exponer el corazón. A continuación, se realizó la apertura del saco pericárdico y se procedió a la disección del árbol coronario hasta exponer la arteria circunfleja izquierda. Una vez expuesta, ésta se suspendió por un hilo de seda 3-0 y se procedió a su oclusión,

mediante la colocación de un “clamp” arterial de 30mm (Fine Science Tools, EE.UU.), (Anexo 7D y 7E). Al término de los 60 minutos de oclusión (fase de isquemia), se procedió a la liberación de la arteria, iniciando así la fase de reperfusión, que se extendió por 72 horas.

- **Descripción de las fases del ensayo y los grupos experimentales.**

Se emplearon un total de 60 cerdos en el estudio. A todos los animales se les realizó una evaluación clínica inicial que incluyó la determinación del peso y la temperatura corporal, la evaluación de la frecuencia cardíaca y la frecuencia respiratoria, la realización de un ECG de 12 derivaciones, la determinación en sangre de la concentración de hemoglobina, el conteo total de células blancas y la medición de los niveles basales de CK-MB y CRP en suero. Estos exámenes iniciales se realizaron durante el período de aclimatación de los animales, de 7 a 10 días antes de la cirugía.

Un total de cinco cerdos escogidos al azar conformaron el grupo I: Controles Sanos, los cuales no fueron intervenidos quirúrgicamente ni recibieron ningún tratamiento, sino que fueron sacrificados al concluir el período de aclimatación, para obtener las muestras necesarias. El resto de los animales (55 cerdos) fueron sometidos al protocolo de inducción del IMA descrito anteriormente (Tabla 2). La primera fase del estudio correspondió a la estandarización del biomodelo (EBM) de IMA, para lo cual se emplearon 16 cerdos que conformaron el grupo II: EBM-IMA. En la segunda fase del estudio, se realizó la evaluación del efecto cardioprotector del péptido GHRP6 en el modelo de IMA previamente establecido. Para ello se conformaron dos grupos experimentales: el grupo III: Placebo+IMA, 19 cerdos, que recibieron como tratamiento SSF; y el grupo IV: GHRP6+IMA, 20 cerdos, que recibieron el tratamiento con el péptido a una dosis de 400 µg/Kg de p.c.

Tabla 2. Descripción de los grupos experimentales del modelo de IMA en cerdos.

Grupos	No. animales	Inducción del IMA	Tratamiento
Controles Sanos	5	No	No
EBM-IMA	16	Si	No
Placebo+IMA	19	Si	Placebo
GHRP6+IMA	20	Si	GHRP6

La aplicación de los tratamientos se realizó a través de un catéter permanente trans-cutáneo (Cavafix, EE.UU.), (Anexo 7F), cuyo extremo interno se fijó a la orejuela de la aurícula izquierda. Tanto las intervenciones quirúrgicas como la asignación y aplicación de los tratamientos se realizaron a ciegas.

El esquema de administración del GHRP6 a los cerdos infartados se diseñó para investigar, de forma adicional, si el péptido modificaba los cambios eléctricos asociados al episodio de I/R que se detectaban en el ECG. Para ello, los tratamientos (GHRP6/placebo) se administraron: (I) 5 minutos antes de la oclusión de la arteria circunfleja, para evaluar la influencia del péptido sobre la elevación aguda del segmento ST del ECG, que es un indicador del sufrimiento hipóxico; (II) a los 20 minutos de la oclusión arterial, para examinar si el GHRP6 modificaba las arritmias ventriculares asociadas a la isquemia; (III) 5 minutos antes de iniciar el período de reperfusión, para estudiar la influencia del GHRP6 sobre las arritmias de la fase de reperfusión. Posteriormente, los tratamientos se continuaron durante las 72 horas de la reperfusión, mediante la administración de dos dosis diarias de GHRP6/placebo a los animales.

- ***Determinación de las dimensiones del infarto.***

La evaluación de las dimensiones del IMA se realizó de acuerdo a criterios universalmente aceptados y validados en la literatura internacional (Moon y cols., 2003). Para cada animal del estudio se registró el peso total del corazón así como las dimensiones (ancho y largo) del área de daño (Anexo 8A y 8B). Posteriormente, se realizó la disección del infarto (Anexo 8C y 8D) para preparar cortes transversos seriados que se incubaron en solución de Nitroblue Tetrazolium (NBT) (Sigma, Aldrich, EE.UU.), (Anexo 8E). Este reactivo permite determinar con exactitud la masa de tejido necrótico (Vivaldi y cols., 1985). Con este dato se calculó el porcentaje de masa infartada en relación con el peso total del corazón ($\text{masa del infarto} / \text{peso del corazón} \times 100$). La muralidad del infarto (Anexo 8F) se determinó en tres puntos diferentes de la pared del ventrículo izquierdo (VI), para obtener un valor promedio para cada animal. Durante la fase de isquemia se administró por vía endovenosa el reactivo Azul de Evans al 2,5%, el cual permitió determinar las dimensiones (ancho y largo) del área en riesgo del miocardio, es decir, del área de la pared del VI no perfundida y por tanto no coloreada de azul. Este dato se empleó para calcular el porcentaje de área infartada en relación con el área en riesgo ($\text{área del infarto} / \text{área en riesgo} \times 100$), de acuerdo a lo reportado en la literatura internacional (Neuhof y cols., 2004).

- ***Evaluaciones electrocardiográficas.***

Los tiempos transcurridos entre la oclusión de la arteria y la aparición de las modificaciones en el registro de ECG, incluyendo la elevación del ST, los latidos arrítmicos ventriculares y la fibrilación ventricular; se registraron para cada animal del estudio. También se registró, individualmente, la duración de las arritmias de reperfusión. La presencia de ondas Q de necrosis se cuantificó en las 12

derivaciones del ECG, para cada cerdo. Para esto se comparó el ECG efectuado en la evaluación inicial, previo a la inducción del infarto, y el ECG final, registrado a las 72 horas de reperfusión, luego de consolidado el IMA.

- ***Evaluación histológica del miocardio.***

Para la evaluación histológica de los IMA se colectaron al menos dos fragmentos de tejido miocárdico correspondientes al núcleo necrótico, así como de la periferia a dicho núcleo, de aspecto aparentemente sano, para cada animal. La integridad de la pared del VI se evaluó de forma cualitativa. Se realizó además la cuantificación del número de penínsulas necróticas, en base al examen de cortes histológicos, de al menos dos fragmentos de tejido, para cada animal. Se cuantificó también el número total de núcleos dañados irreversiblemente (exhibiendo cariorresis, cariólisis o cariopícnosis), en un total de 10 campos microscópicos (20X), escogidos al azar, para cada animal.

- ***Evaluaciones bioquímicas en el suero.***

Para cada cerdo del estudio se colectaron muestras de sangre en tres momentos: (T0) antes de la cirugía; (T1) 30 minutos después de iniciada la fase de reperfusión; (T2) al finalizar las 72 horas de la reperfusión. Las determinaciones de la enzima CK-MB y de la proteína CRP en el suero se realizaron empleando estuches comerciales (Roche Diagnostics, Suiza; Diagnostics Automation; EE.UU.), y en ambos casos se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

- ***Evaluación del estrés oxidativo en el miocardio.***

Durante la autopsia de los cerdos se colectaron biopsias transmurales de la pared del VI, de una zona adyacente al núcleo necrótico, para cada animal de los grupos Placebo+IMA, GHRP6+IMA y Controles Sanos. La acumulación de MDA, HPT, así como la actividad de las enzimas SOD y Catalasa, se determinaron en muestras de homogenados de tejido cardíaco preparadas a partir de un fragmento de estas biopsias, de acuerdo a las metodologías detalladas anteriormente.

- ***Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el miocardio.***

Un pequeño fragmento de las biopsias del VI colectadas como se describió anteriormente, de cinco cerdos seleccionados al azar de los grupos GHRP6+IMA, Placebo+IMA y Controles Sanos; se procesaron para comparar la expresión transcripcional del gen IGF-1 en el miocardio. En estas mismas muestras se determinó también el nivel transcripcional del gen de expresión constante β -actina, el cual se empleó para la normalización del resultado.

III.5.2 Modelo experimental de Miocardiopatía Dilatada inducida por la administración de la Doxorubicina en ratas.

- ***Protocolo de inducción de la Miocardiopatía Dilatada.***

La DX se administró por vía i.p. a una dosis de 2 mg/Kg de p.c, dos veces por semana (lunes y viernes), durante 52 días (dosis acumulada de 30 mg/Kg de p.c) (Mukherjee y cols., 2003).

- ***Descripción de las fases del ensayo y los grupos experimentales.***

Del total de 60 ratas empleadas en el estudio, 12 animales conformaron el grupo I: Controles Sanos; los que permanecieron sin recibir ninguna inyección y fueron sacrificados al finalizar el ensayo (día 67) (Figura 1). El resto de los animales (48 ratas), fueron incluidos en el protocolo de inducción de la MCD descrito anteriormente.

Este experimento se dividió en dos fases. La primera, fase de prevención, se desarrolló durante el período de inducción de la MCD, durante el cual se evaluó la potencialidad del GHRP6 de prevenir la enfermedad al administrarlo de forma concomitante a la DX. En la segunda, fase de reversión, se inició el tratamiento con el GHRP6 una vez que se diagnosticó la MCD, para así evaluar su potencialidad en la reversión de la enfermedad. Los detalles de los grupos experimentales de cada fase se describen a continuación (Figura 1).

-Grupos experimentales de la fase de prevención.

Grupos II y III: DX+GHRP6 y DX+Placebo, 12 ratas cada uno. A estos animales se les administró la DX durante 52 días. De forma concomitante, recibieron dos administraciones diarias (i.p.) de GHRP6 (dosis: 400 µg/Kg de p.c) y SSF, respectivamente, durante el período de inducción de la enfermedad. La mortalidad acontecida en la fase de prevención de la MCD fue registrada. Los animales que sobrevivieron, de ambos grupos, fueron sacrificados en el día 52 del estudio.

-Grupos experimentales de la fase de reversión.

Los 24 animales restantes fueron sometidos por igual al protocolo de inducción de la MCD con la DX en 52 días. A continuación, todas las ratas fueron evaluadas individualmente mediante ecocardiografía. Los resultados obtenidos se utilizaron para conformar los dos grupos experimentales de la fase de reversión, descritos a continuación; de forma tal que estos no difieren entre sí en los parámetros ecocardiográficos estudiados.

Grupos IV y V: GHRP6 y Placebo, 12 ratas cada uno. Estos animales recibieron dos administraciones diarias (i.p.) de GHRP6 (dosis: 400 µg/Kg de p.c) y SSF, respectivamente, por 15 días; iniciando a partir del día 52 del ensayo. Durante esta fase no se administró el cardiotóxico a los

animales, lo que puede favorecer la reversión espontánea del modelo. Por tal motivo, empleamos un esquema corto de tratamiento terapéutico. La mortalidad acontecida en las ratas durante la fase de reversión de la MCD fue registrada. Al finalizar el período de administración de los tratamientos (día 67), todas las ratas que sobrevivieron, en ambos grupos, fueron sacrificadas.

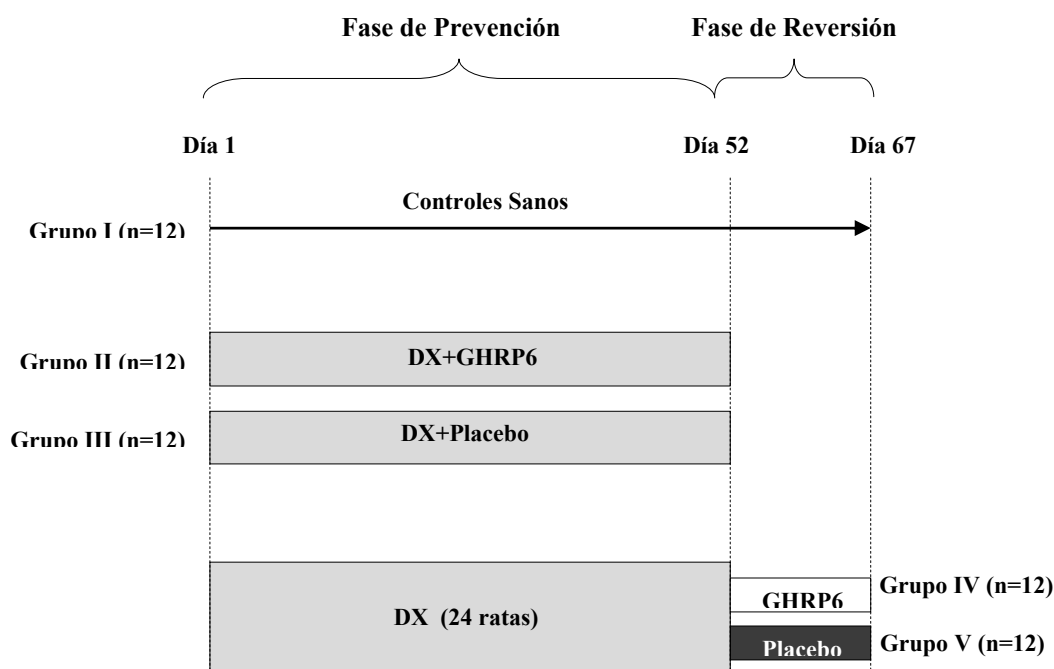


Figura 1. Diseño experimental del modelo de Miocardiopatía Dilatada inducido en ratas. En el esquema se representan las fases del estudio y los grupos experimentales utilizados. Los animales del Grupo I se utilizaron como Controles Sanos para ambas fases del estudio (flecha negra). El color gris indica el período de administración de la Doxorrubicina (DX) sola o con los tratamientos indicados. Los Grupos II y III corresponden a la Fase de Prevención (día 1-día 52); mientras que los grupos IV y V corresponden a la Fase de Reversión (día 52-día 67).

- **Evaluación del miocardio por ecocardiografía.**

Los estudios por ecocardiografía (ECO) se realizaron con un equipo Sonos 5500, acoplado a un transductor lineal de 11-15 MHz (Philips, EE.UU.), (Anexo 9A y 9B). Los parámetros estructurales evaluados del ventrículo izquierdo (VI) fueron: diámetro diastólico del VI (DdVI), diámetro sistólico del VI (DsVI), grosor del septum intra-ventricular en diástole/sístole (G.S.d/s) y grosor de la pared posterior del VI en diástole/sístole (G.PP.d/s). Estos parámetros estructurales se midieron empleando imágenes ecocardiográficas obtenidas en modo-M (Anexo 9C a 9H). El parámetro

funcional evaluado fue el porcentaje de fracción de eyección del VI (% FEVI); el cual se define como la fracción de volumen de sangre impulsada en cada sístole, en relación con el volumen total de sangre del ventrículo en la diástole [(volumen diastólico–volumen sistólico) / volumen diastólico x 100]. Para el cálculo de los volúmenes del VI a partir de los diámetros medidos en modo M, se empleó la fórmula modificada por Teichholz ($7 \times Dd/sVI^3 / 2,4 + Dd/sVI$) (Braunwald E, 2005). Se calculó también el índice de remodelado del VI (IRVI), como la razón entre el DdVI y la suma de los grosores de ambas paredes en la diástole (G.S.d+G.PP.d).

Los animales del grupo Controles Sanos se sometieron a una evaluación ecocardiográfica al inicio del experimento, para obtener los Valores Basales. Durante la fase de prevención, se realizaron evaluaciones ecocardiográficas a los grupos DX+GHRP6 y DX+Placebo en diferentes tiempos (dosis acumulada del cardiotoxico): a los 14 días (8 mg/Kg p.c de DX), 24 días (14 mg/Kg p.c de DX), 37 días (22 mg/Kg p.c de DX) y 52 días (30mg/Kg p.c de DX). En la fase de reversión, se realizaron tres sesiones de estudios ecocardiográficos: una al finalizar el período de intoxicación con la DX, en el día 52 del experimento, para formar los grupos ecocardiográficamente balanceados; y otras dos evaluaciones al terminar la primera y segunda semana de administración de los tratamientos terapéuticos, es decir, con 10 y 20 dosis administradas del GHRP6 y de SSF. A los animales del grupo Controles Sanos se les realizaron evaluaciones ecocardiográficas adicionales al finalizar ambas fases del ensayo.

- ***Evaluaciones histológicas.***

Durante la realización de las autopsias se registró el peso del corazón, los pulmones y el hígado, para calcular los índices de pesos relativos (peso órgano/peso corporal x 100). Los corazones se fragmentaron en cuatro cortes sagitales desde el ápex hasta la base. El corte correspondiente a la altura de la válvula mitral se utilizó para la evaluación histológica. Igualmente se colectaron fragmentos de los pulmones, los riñones y el hígado. Todas las muestras destinadas para estudios histológicos se procesaron como se detalló anteriormente. Empleando láminas de histología teñidas con hematoxilina/eosina, se realizaron los siguientes estudios: evaluación semicuantitativa de la afectación estructural de las paredes del VI; cuantificación del porcentaje de miofibrillas dañadas; del porcentaje de bronquios con necrosis de la mucosa epitelial en los pulmones; del porcentaje de túbulos renales con daños irreversibles en las células epiteliales; y una evaluación semicuantitativa de la congestión pasiva del hígado. Los detalles de las escalas histológicas utilizadas, así como de las metodologías empleadas para estas evaluaciones, se describen en la tabla del Anexo 10.

- ***Evaluación del miocardio por Microscopía Electrónica de Transmisión.***

Para el estudio por MET, se colectaron pequeños fragmentos de la pared del VI de tres ratas de los grupos GHRP6 y Placebo (fase de reversión), así como del grupo Controles Sanos. El criterio de selección de estos animales fue la evaluación ecocardiográfica después de concluida la administración de los tratamientos. Se analizaron un total de 20 microfotografías a diferentes magnificaciones. La presencia de cambios patológicos en la ultraestructura de las miofibrillas, las mitocondrias y las uniones intercelulares, fueron evaluados cualitativamente en los tres grupos experimentales, a ciegas.

- ***Evaluaciones bioquímicas en el suero.***

Las evaluaciones bioquímicas en el suero de las ratas se realizaron solamente en los grupos DX+GHRP6 y DX+Placebo, de la fase de prevención de la MCD. En los días 14 y 35 del período de administración de la DX, se obtuvieron muestras de sangre de los plexos retro-orbitales de estos animales, previamente anestesiados. Durante la realización de las autopsias, día 52, se colectaron las últimas muestras de sangre de la fase de prevención, a través de la aorta abdominal. Se realizó también una extracción de sangre a los animales del grupo Controles Sanos al inicio del experimento, para obtener los valores basales, y durante la realización de las autopsias. Las alícuotas de estos sueros se utilizaron para determinar la concentración de HPT, MDA, y la actividad de las enzimas SOD y Catalasa. En las muestras de suero del día 52, se realizó también la determinación de los niveles de ALAT en estos tres grupos experimentales.

- ***Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el miocardio.***

Durante la realización de las autopsias, se colectaron fragmentos del VI de cinco animales escogidos al azar de los grupos DX+GHRP6 y DX+Placebo, ambos de la fase de prevención, así como del grupo Controles Sanos. Estas muestras se procesaron como se describió anteriormente, para evaluar en ellas la expresión transcripcional de los genes Bcl-2, Bax y β -actina.

III.6 Evaluación de los efectos del GHRP6 en modelos experimentales de enfermedades hepáticas

III.6.1 Modelo experimental de Isquemia/Reperfusión hepática y Daño Múltiple de Órganos.

- ***Protocolo de inducción de la Isquemia/Reperfusión hepática.***

Los animales anestesiados (uretano 10 mg/Kg de p.c) se colocaron en posición supina para realizar una laparotomía, y colocarles un “bulldog clamp” (Fine Science Tools, EE.UU.) al nivel de la arteria hepática que irriga el lóbulo derecho del hígado. Al transcurrir los 90 minutos de oclusión

(fase de isquemia), se eliminó el “clamp”, estableciéndose un tiempo de reperfusión de 120 minutos. Al finalizar este período, los animales se sacrificaron mediante exanguinación total y se colectaron las muestras de interés.

- **Descripción de los grupos experimentales.**

Se emplearon un total de 40 ratas, que luego de un período de adaptación de siete días se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales, 10 ratas por grupo (Tabla 3). El Grupo I: Simulador; en este caso las ratas se anestesiaron y se les realizó la laparotomía y manipulación quirúrgica, sin la inducción de la isquemia. El Grupo II: Placebo+I/R; animales que se sometieron al episodio de I/R y que recibieron previamente, 40 minutos antes, una inyección i.p. de SSF. El Grupo III: GHRP6+I/R; animales que se sometieron también al episodio de I/R y que recibieron, 40 minutos antes, una única inyección profiláctica del GHRP6, i.p., a una dosis de 400 µg/Kg de p.c. Por último, el grupo IV: Sanos+GHRP6; estos animales recibieron una única administración i.p. del péptido (dosis de 400 µg/Kg de p.c) pero no se sometieron a la I/R; sino que permanecieron conscientes durante un período de tiempo equivalente a los 40 minutos de preconditionamiento y la duración del episodio de I/R (210 minutos), para un total de 250 minutos, y posteriormente fueron sacrificados.

Tabla 3. Descripción de los grupos experimentales del modelo de I/R hepática en ratas.

Grupos	No. animales	Inducción de la I/R	Tratamiento
Simulador	10	No	No
Placebo+I/R	10	Si	Placebo
GHRP6+I/R	10	Si	GHRP6
Sanos+GHRP6	10	No	GHRP6

- **Estudios histológicos.**

Al finalizar la reperfusión, se tomaron muestras para estudios histológicos del lóbulo derecho del hígado y de otros órganos como los pulmones, los riñones, el jejunio y el íleon. El daño hepático fue semicuantificado utilizando una modificación de la escala de Suzuki (Anexo 11A), (Shen y cols., 2003a). Se determinó también el porcentaje de área del intestino delgado que mostraba cambios macroscópicos tales como petequias y áreas de hemorragias, con respecto a la longitud total del órgano. Los cambios microscópicos en el intestino, específicamente los daños en la mucosa, se

evaluaron cuantitativamente de acuerdo a los criterios de la escala de Chiu (Anexo 11B), (Chiu y cols., 1970). Las afectaciones en el epitelio renal, así como en los pulmones, se clasificaron para cada animal utilizando escalas de creciente severidad, diseñadas en base a parámetros reportados previamente en la literatura (Anexos 11C y 11D), (Yassin y cols., 2002).

- ***Evaluaciones bioquímicas en el suero.***

Las muestras de sangre de todas las ratas del estudio fueron colectadas por punción intramiocárdica, al finalizar la reperfusión. En las muestras de suero obtenidas, se determinaron los niveles de las enzimas ALAT y ASAT, así como la concentración de creatinina.

- ***Evaluaciones bioquímicas en los tejidos.***

Las concentraciones de HPT, MDA, así como la actividad de las enzimas SOD y Catalasa, fueron cuantificadas en muestras de homogenado de hígado de todos los animales del estudio. Adicionalmente se determinó la actividad específica de la isoforma SODMn, empleando cianuro de sodio (2mM), que es un inhibidor de las isoformas SODCu/Zn (Ajamieh y cols., 2005). La resta de la actividad detectada para la SODMn en presencia de cianuro, de la actividad total de la SOD, se corresponde a la actividad de las isoformas SODCu/Zn.

En este estudio se cuantificó también la actividad de la enzima MPO, en muestras de hígado e intestino delgado, mediante una modificación de la técnica descrita por Krawisz y colaboradores (Krawisz y cols., 1984). Para esto, los fragmentos de tejidos se homogenizaron (1:10) en una solución de fosfato de potasio (50 mM; pH 6) que contiene 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Posteriormente, los homogenados se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C (Centrifuga 5415R, Eppendorf, EE.UU.). Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para evaluar la actividad de esta enzima. Una unidad de MPO se definió como la cantidad de enzima que degrada 1µmol de peróxido de hidrógeno por minuto a 25°C.

- ***Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el hígado.***

Durante la realización de las autopsias a las ratas, se colectaron pequeños fragmentos del lóbulo del hígado sometido al episodio de I/R, de cinco animales de los grupos Simulador, Placebo+I/R y GHRP6+I/R, escogidos al azar. Estos fragmentos de tejido se procesaron para purificar el ARN total, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. En estas muestras se evaluó, de forma semicuantitativa, la expresión transcripcional de los genes: IGF-1, HIF-1 α , PI3K, PKB y β -actina; tanto en los animales sometidos a la I/R como en los del grupo Simulador.

III.6.2 Modelo experimental de Cirrosis Hepática inducida por la administración de Tetracloruro de Carbono en ratas.

- ***Protocolo de inducción de la Cirrosis Hepática.***

El CCL₄ se administró por vía s.c. a una dosis de 1μL/g de p.c, durante cinco o siete meses, dos veces por semana, lunes y viernes. En el momento de la inyección, el CCL₄ se diluyó (1:1) en aceite mineral (Alvarez y cols., 2007).

- ***Descripción de las fases del ensayo y los grupos experimentales.***

Se emplearon un total de 75 ratas en el estudio, siete de las cuales permanecieron como grupo I: Controles Sanos. Estas ratas no recibieron ninguna inyección y fueron sacrificadas al finalizar el experimento, en el séptimo mes (Figura 2). El resto de los animales (68 ratas), se incluyeron en el protocolo de inducción de la cirrosis hepática que se describió anteriormente.

Este ensayo se dividió en dos fases. La primera, fase de prevención, se desarrolló durante los primeros cinco meses de administración del CCL₄, durante los cuales se administró de forma concomitante el GHRP6, para evaluar su efecto en la prevención de la cirrosis. La segunda, fase de reversión, se desarrolló durante el sexto y séptimo mes del estudio, en los que se administró el GHRP6 a animales cirróticos, para evaluar su efecto en la reversión de la enfermedad. Los detalles de los grupos experimentales de cada fase se describen a continuación (Figura 2).

-Grupos experimentales de la fase de prevención.

Grupos II y III: CCL₄+GHRP6 y CCL₄+Placebo, 12 ratas cada uno. A estos animales se les administró el CCL₄ durante los primeros cinco meses del estudio. Concomitantemente, recibieron dos administraciones diarias (i.p.) de GHRP6 (dosis de 400 μg/Kg de p.c) o SSF, respectivamente. Las 12 ratas de ambos grupos fueron sacrificadas al concluir la fase de prevención de la cirrosis, es decir, al cumplirse el quinto mes.

-Grupos experimentales de la fase de reversión.

Las 44 ratas restantes fueron también sometidas al protocolo de intoxicación con CCL₄ durante los cinco primeros meses del ensayo. A continuación, estos animales se evaluaron individualmente, mediante estudios bioquímicos y por laparotomía (ver detalles más adelante). Los resultados obtenidos se utilizaron para conformar los cuatro grupos experimentales de la fase de reversión de la cirrosis que se describen a continuación; en los cuales se agruparon los animales de forma homogénea en términos de la severidad de la enfermedad hepática.

Grupos IV y V: GHRP6-15d y Placebo-15d, 10 ratas cada uno. Estos animales recibieron dos administraciones diarias, (i.p.), de GHRP6 (dosis de 400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de p.c) o SSF, respectivamente, durante 15 días; comenzando al iniciar el sexto mes del experimento. Durante estos 15 días de tratamiento no se administró el CCL_4 a los animales, lo que puede favorecer la reversión espontánea del modelo (Issa y cols., 2004). Es por esto que se empleó un esquema corto de tratamiento terapéutico. Al finalizar el mismo, todas las ratas fueron sacrificadas.

Grupos VI y VII: GHRP6-60d y Placebo-60d, 12 ratas cada uno. Estos animales se trataron con GHRP6 o SSF, respectivamente, del mismo modo que para los grupos IV y V pero por 60 días; es decir, durante el sexto y séptimo mes del experimento. En el caso de estos dos grupos, la intoxicación con el CCL_4 continuó interrumidamente hasta el final del séptimo mes, para evitar la regresión espontánea de la fibrosis. Al finalizar los dos meses de tratamiento terapéutico, todas las ratas de estos dos grupos fueron sacrificadas.

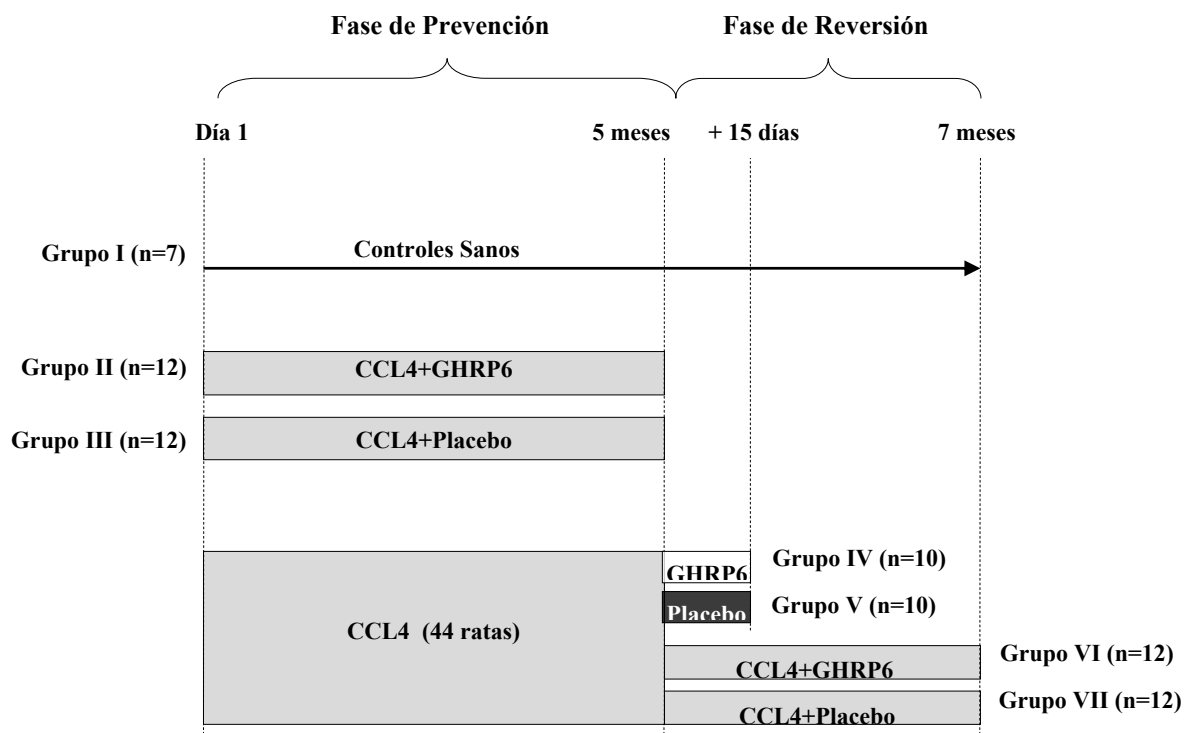


Figura 2. Diseño experimental del modelo de Cirrosis Hepática inducido en ratas. En el esquema se representan las fases del estudio y los grupos experimentales utilizados. Los animales del Grupo I se utilizaron como Controles Sanos para ambas fases del estudio (flecha negra). El color gris indica el período de administración del tetracloruro de carbono (CCL_4) solo o con los tratamientos indicados en cada caso. Los Grupos II y III corresponden a la Fase de Prevención, de cinco meses de duración. Los Grupos IV y V corresponden a la Fase de Reversión, los cuales recibieron los tratamientos indicados por 15 días, iniciando al concluir el quinto mes del ensayo. Los grupos VI y VII pertenecen también a la Fase de Reversión, pero en este caso recibieron los tratamientos indicados por dos meses y se mantuvo la administración del CCL_4 .

- ***Evaluación del hígado por ultrasonido.***

Los estudios de ultrasonido se realizaron con un equipo Aloka (Japón) acoplado a un transductor de 11 MHz (Anexo 12A y 12B). La evaluación ultrasonográfica comparativa entre los grupos Controles Sanos, CCL4+GHRP6 y CCL4+Placebo, se realizó al finalizar la fase de prevención. Igualmente se realizó un estudio por ultrasonido a los grupos Controles Sanos, GHRP6-60d y Placebo-60d, al finalizar la fase de reversión. Los parámetros evaluados fueron: diámetro de la porta, ascitis, nodularidad del parénquima, incremento de la ecogenicidad y evaluación de la textura del parénquima hepático. Algunos de los cambios detectados se muestran en las imágenes del Anexo 12C y 12D. Estos parámetros fueron semicuantificados empleando las escalas descritas en el Anexo 13. Se definió como *Índice de Fibrosis por Ultrasonido* (IFU), la suma de los valores obtenidos en las cuatro escalas. Para garantizar el rigor adecuado en estas determinaciones, las imágenes de ultrasonido fueron analizadas a ciegas por los especialistas.

- ***Evaluación morfológica de los hígados cirróticos por laparotomía.***

Los 44 animales empleados en la fase de reversión de la cirrosis se sometieron a un estudio por laparotomía al concluir el quinto mes de intoxicación con CCL₄ (Anexo 14). De esta forma, los hígados cirróticos se inspeccionaron macroscópicamente y se clasificaron de acuerdo con la escala morfológica de la Organización Mundial de la Salud en: micronodulares, macronodulares y mixtos (Anthony y cols., 1977). Los resultados de esta clasificación se emplearon para conformar los grupos experimentales balanceados de la fase de reversión de la enfermedad.

- ***Evaluaciones histológicas en la Cirrosis.***

Se colectaron al menos tres fragmentos provenientes de lóbulos diferentes del hígado, los que fueron destinados a estudios histológicos. Todas las evaluaciones histomorfométricas se realizaron con láminas de tejido hepático teñidas con la coloración especial Tricrómica de Mallory. Esta tinción permite diferenciar específicamente las fibras colágenas (color azul), del parénquima hepático y restantes componentes de la matriz extracelular (color rojo). Los análisis histomorfométricos se realizaron utilizando el programa ImageJ (NIH, EE.UU.). Para ello se capturaron imágenes digitales en formato RGB, con una resolución de 3072 x 2304 píxeles, empleando un microscopio (Carl Zeiss Axiotron, Alemania) acoplado a una cámara digital (Canon PC1089, Japón). Se realizó la cuantificación del número total de nódulos cirróticos, del porcentaje de área hepática cubierta por grasa (% Grasa) y por depósito de material fibrótico (% Fibrosis), así como el grosor de los cordones fibróticos (en micras), para todos los animales del estudio. En el

caso de los grupos GHRP6-15d y Placebo-15d se determinó además el porcentaje de fibras colágenas (% Colágeno) con respecto al área total de material fibrótico. En la tabla del Anexo 15 se detallan las metodologías de las mediciones histomorfométricas realizadas.

- ***Estudios de inmunohistoquímica.***

Para realizar los estudios de inmunohistoquímica, se utilizaron muestras de tres animales de cada grupo experimental, escogidos en base a las observaciones histológicas previas. Los cortes de tejidos seleccionados se fijaron en portaobjetos sialinizados (Dako, Dinamarca). Las reacciones de inmunodetección se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes del estuche comercial Dako Cytomation LSAB® + System-HRP (Dako, Dinamarca). De la firma Santa Cruz Biotechnology Inc (EE.UU.) se adquirieron los siguientes anticuerpos (dilución): anti-TGF- β (1:100), anti-p53 (1:50) y anti-FasL (1:200). De la firma Dako (Dinamarca) se adquirieron también los siguientes anticuerpos: anti- α SMA (1:100), anti-Ciclina D1 (1:100) y anti-Vimentina (1:50). Las muestras se incubaron por 30 minutos con los anticuerpos diluidos en solución reductora de fondo (Dako, Dinamarca). Finalmente, las láminas se contrastaron con hematoxilina y fueron observadas, a ciegas, por al menos dos investigadores.

- ***Evaluación del hígado por Microscopía Electrónica de Transmisión.***

Para el estudio por MET, se colectaron fragmentos del lóbulo central hepático de dos animales de los grupos GHRP6-15d, Placebo-15d y Controles Sanos; seleccionados en base al aspecto macroscópico del hígado. Se analizaron, a ciegas, un total de 40 microfotografías de diferentes magnificaciones. La presencia de los siguientes cambios en la ultra-estructura de los hepatocitos: dilatación del Retículo Endoplasmático Liso, del Retículo Endoplasmático Rugoso y del Complejo de Golgi; destrucción mitocondrial (balonamiento, pérdida de las crestas mitocondriales, destrucción de la matriz mitocondrial); presencia de fibras colágenas, fibroblastos y grasa; todos fueron cualitativamente evaluados, de forma comparativa, entre los diferentes grupos experimentales.

- ***Evaluaciones bioquímicas en el suero.***

Durante las autopsias, se colectaron muestras de sangre de todos los animales del estudio, por punción intra-miocárdica. En otros puntos de muestreo, se obtuvieron las muestras de sangre del plexo retro-orbital de los animales, previamente anestesiados. En el primer día del ensayo, se colectaron muestras de sangre de los animales del grupo Controles Sanos para obtener los valores basales. De todos los animales de la fase de prevención, se obtuvieron muestras de sangre al

finalizar el segundo y quinto mes del ensayo. En la fase de reversión, se tomaron muestras de sangre, de todos los animales, al finalizar el quinto mes de intoxicación con CCL₄ y al concluir los esquemas de tratamiento terapéutico con el GHRP6 y la SSF. Los parámetros evaluados en el suero fueron: ALAT, ASAT, concentración de colesterol, de triglicéridos, de VLDL, de albúmina y de proteínas totales.

- ***Evaluación del estrés oxidativo en el hígado.***

La evaluación de los parámetros de estrés oxidativo se realizó en homogenados de fragmentos del lóbulo central hepático, de todos los animales del estudio. Los parámetros: HPT, MDA, actividad de la SOD y de la Catalasa, se evaluaron de acuerdo a las metodologías descritas anteriormente. Además de estos parámetros, se determinó el Potencial de Peroxidación Lipídica (PPL), mediante la determinación de los niveles de MDA en muestras incubadas a 37°C, por 24 horas, con una solución de Cu²⁺. Se cuantificó también la concentración de Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas (PAOP), de acuerdo a la técnica de Witko-Sarsat y colaboradores (Witko-Sarsat y cols., 2003).

- ***Evaluación de la expresión transcripcional de genes en el hígado.***

Pequeños fragmentos del lóbulo central hepático de cinco animales de los grupos GHRP6-15d, Placebo-15d y Controles Sanos, escogidos al azar, se emplearon para estudiar la expresión de genes involucrados en el proceso de fibrogénesis. Estas muestras se procesaron como se describió anteriormente para obtener el ARN total y evaluar la expresión transcripcional de los genes TGF-β, CTGF, SODMn, MMP13 y β-actina.

III.7 Procesamiento estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el paquete Graphpad Prism (California, EE.UU.), versión 4 para Windows. Los datos experimentales se evaluaron inicialmente por la prueba de Kolmogorov-Smirnov para conocer las características de la distribución ($p < 0,05$). Como el resultado de esta prueba se correspondió en todos los casos con una distribución normal del grupo de datos, se realizaron comparaciones entre pares de grupos empleando la prueba t; y para las comparaciones múltiples se empleó un ANOVA seguido de la prueba t de Neuman Keuls. Para evaluar la significación estadística de los datos expresados en forma de porcentaje, se empleó la prueba exacta de Fisher. Los resultados de sobrevida se compararon por la prueba de Logrank. El nivel de significación establecido fue de al menos $p < 0,05$ en todos los casos.

IV. RESULTADOS

IV.1 Evaluación del péptido GHRP6 en un modelo de IMA en cerdos

IV.1.1 Resultados del examen clínico pre-experimental de los cerdos del ensayo.

En la Tabla 4 se resumen los principales resultados de la evaluación realizada a los cerdos antes de someterlos a la cirugía. La similitud de los valores entre los grupos experimentales indica que el experimento fue realizado en cerdos sanos, y que no existieron diferencias clínicas entre los grupos.

Tabla 4. Examen clínico pre-experimental de los cerdos.

Parámetros	Grupo EBM-IMA (n=16)	Grupo Placebo+IMA (n=19)	Grupo GHRP6+IMA (n=20)
Peso Corporal (Kg)	25,7 ± 2,0	27,6 ± 2,4	26,3 ± 2,3
Frecuencia Cardiaca (L/min)	73,1 ± 4,2	75,2 ± 6,1	74,3 ± 7,0
Frecuencia Respiratoria (R/min)	44,0 ± 3,2	42,1 ± 4,0	46,3 ± 6,3
Hemoglobina (g/L)	123,8 ± 7,7	120,6 ± 6,4	121,8 ± 7,0
Células blancas (x 10 ⁹ /L)	8,1 ± 1,4	9,1 ± 2,2	8,0 ± 1,7
CK/MB (U/L)	1267 ± 56,2	1270 ± 43,3	1288 ± 82,0
CRP (µg/mL)	0,087 ± 0,004	0,090 ± 0,003	0,093 ± 0,004

Los datos se representan como el promedio ± DE por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados; p>0,05 en todos los casos.

IV.1.2 Caracterización del modelo porcino de IMA.

- ***Resultados de sobrevivida en la fase de EBM.***

De los 16 cerdos empleados en la fase de EBM, solamente ocho animales (50%) sobrevivieron el período de 60 minutos de isquemia ensayado. Todas las muertes se debieron a episodios de fibrilación ventricular por la isquemia. Durante el período de reperfusión, 72 horas, no falleció ningún animal. En el 100% de los cerdos que sobrevivieron, se observaron IMA fácilmente diagnosticables al examen macroscópico del corazón, después de las 72 horas de reperfusión.

- ***Resultados de los estudios morfohistológicos en la fase de EBM.***

El 75% de los animales que sobrevivieron en la fase de EBM exhibieron IMA restringidos a cara lateral; mientras que, en el 25% restante, los IMA eran tan extensos que se localizaban anatómicamente en cara lateral y media-posterior. Además de la típica zona blanca correspondiente a la necrosis, se observaron también extensas zonas de hemorragia, tanto sub-epicárdica como sub-

endocárdica, en la pared del ventrículo izquierdo (Anexo 8E). La observación microscópica evidenció que el proceso de lisis de las miofibrillas en el centro del IMA resultó prácticamente masivo, y se acompañó de una mayor invasión de células inflamatorias que en las zonas adyacentes al núcleo, donde era menor el daño en las miofibrillas.

- **Resultados de las evaluaciones electrocardiográficas en la fase de EBM.**

Los corazones de la fase de EBM fueron muy similares en cuanto a los cambios producidos en el ECG asociados a la I/R. El fenómeno de supradesnivel del segmento ST, el establecimiento de imagen en espejo y la presencia de onda Q patológica, fueron algunos de los cambios del ECG observados (Anexo 16). La fibrilación ventricular durante la isquemia se inició frecuentemente de 15 a 20 minutos después de la oclusión de la arteria circunfleja izquierda, y siempre estuvo antecedida de trastornos agudos de la conducción y el ritmo, los que permitían predecir fácilmente su ocurrencia. Durante esta fase se caracterizaron también las arritmias de reperfusión, dadas por taquicardias ventriculares, ritmo de la unión acelerado y extrasístoles en parejas (Anexo 16). Estos resultados permitieron diseñar el esquema de administración del péptido GHRP6, con el objetivo adicional de evaluar su potencial incidencia sobre los eventos eléctricos asociados a la I/R.

De manera general, el modelo de IMA establecido en cerdos criollos exhibió las siguientes características: repetible desde el punto de vista metodológico y práctico; con una sobrevida intra-operatoria de un 50% y post-operatoria a las 72 horas de un 100%; una lesión reproducible desde el punto de vista topográfico, localizada en la cara lateral del ventrículo izquierdo; IMA detectables por el ECG y por estudios anátomo-patológicos, incluyendo cambios microscópicos, luego de 72 horas de reperfusión. Estos resultados nos permitieron avanzar a la segunda fase del experimento.

IV.1.3 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en el modelo porcino de IMA.

- **Resultados de sobrevida.**

De los 19 cerdos intervenidos quirúrgicamente en el grupo Placebo+IMA, la fibrilación ventricular provocó la muerte de 10 animales (53%) durante la isquemia. En el caso del grupo GHRP6+IMA, 11 cerdos de un total de 20 (55%), fallecieron por fibrilación. Como puede notarse, las arritmias malignas asociadas al período de isquemia provocaron la muerte de aproximadamente el 50% de todos los animales del estudio, independientemente del tratamiento empleado.

- **Impacto del GHRP6 en las dimensiones del IMA.**

Como se aprecia en la Tabla 5, los pesos de los corazones de los animales involucrados en el estudio fue muy similar entre los tres grupos experimentales (todas las comparaciones $p > 0,05$). Por su parte,

el tratamiento con el GHRP6 redujo significativamente el peso absoluto del territorio infartado, al compararlo con la masa del infarto que se obtuvo en el grupo Placebo+IMA ($p=0,001$). Consecuentemente, el GHRP6 redujo en un 78% el valor de la masa infartada ajustada al peso total del corazón ($p=0,005$). Cuando se compararon los valores de área en riesgo entre sí, se demostró que no existieron diferencias estadísticas entre los tres grupos experimentales (todas las comparaciones $p>0,05$); lo cual sugiere que los resultados no estuvieron influenciados por la aparición de redes de circulación colateral. Al ajustar el valor del área infartada con relación al valor del área en riesgo del miocardio, se obtuvo una reducción significativa del infarto en los animales tratados con el GHRP6, cercana al 80% ($p<0,0001$). En correspondencia con la demostración de que el GHRP6 fue capaz de reducir significativamente el territorio infartado; el grosor del infarto, evaluado como la extensión de endocardio a epicardio (muralidad), disminuyó también significativamente en los animales del grupo GHRP6+IMA, en comparación con los animales del grupo Placebo+IMA ($p=0,005$).

Tabla 5. Influencia del GHRP6 sobre el peso y las dimensiones de los infartos.

Parámetros	Grupo EBM-IMA (n=8)	Grupo Placebo+IMA (n=9)	Grupo GHRP6+IMA (n=9)	p
Peso del Corazón (g)	158,2 ± 11,6	156,2 ± 15,5	153,9 ± 26,2	p=0,81
Masa Infartada (g)	39,4 ± 10,6	37,4 ± 11,8	12,0 ± 10,1	p=0,001
% de masa infartada	24,9 ± 4,8	24,0 ± 7,2	7,8 ± 5,6	p=0,005
Área Infartada (cm ²)	32,1 ± 12,3	30,3 ± 14,7	6,5 ± 6,3	p=0,01
Área en riesgo (cm ²)	40,4 ± 6,8	38,8 ± 8,0	39,7 ± 4,8	p=0,78
% Área infartada/Área riesgo	77,9 ± 18,2	74,5 ± 23,8	15,3 ± 14,8	p<0,0001
Muralidad del infarto (cm)	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,3	0,7 ± 0,6	p=0,005

Los datos se representan como el promedio ± DE para cada grupo experimental. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados. Los valores de significación obtenidos en las comparaciones estadísticas entre los grupos Placebo+IMA vs GHRP6+IMA se muestran también en la tabla. En las comparaciones entre el grupo EBM-IMA y Placebo+IMA se obtuvo siempre $p>0,05$.

- **Efecto del GHRP6 en los parámetros del ECG.**

En la Tabla 6 se resumen las principales modificaciones detectadas durante el seguimiento electrocardiográfico del episodio de I/R, en cada grupo experimental. Como se puede apreciar, la elevación del segmento ST se produjo de forma inmediatamente posterior (en menos de un minuto)

a la oclusión de la arteria, en los tres grupos experimentales, independientemente del tratamiento administrado. En la Tabla 6 se muestra también, que el debut de las primeras extrasístoles ventriculares se produjo siempre de 15 a 20 minutos posteriores a la oclusión de la arteria circunfleja, sin existir diferencias entre los grupos experimentales. La ocurrencia de la fibrilación ventricular asociada a la isquemia también se produjo de forma homogénea entre los tres grupos experimentales, e igualmente en los 15 a 20 minutos posteriores a la colocación del “clamp”. La duración de las alteraciones eléctricas producidas en la reperfusión, las que se iniciaron inmediatamente después de retirar el “clamp”, fue de aproximadamente cinco minutos en los tres grupos experimentales.

Tabla 6. Cambios detectados en el ECG durante la I/R del miocardio.

Parámetros del ECG	Grupo EBM-IMA (n=8)	Grupo Placebo+IMA (n=9)	Grupo GHRP6+IMA (n=9)
Debut - Elevación del ST (seg.)	54,0 ± 3,1	53,1 ± 2,6	58,4 ± 5,3
Debut - Arritmias ventriculares (min.)	18,5 ± 11,2	17,4 ± 10,4	19,8 ± 13,8
Debut - Fibrilación ventricular (min.)	17,2 ± 12,2 (8)	15,6 ± 13,2 (10)	20,8 ± 5,4 (11)
Duración - Arritmias de reperfusión (min.)	5,7 ± 5,0	5,9 ± 5,7	4,6 ± 5,2

Los datos se representan como el promedio ± DE para cada grupo experimental. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados; $p > 0,05$ en todos los casos. En el caso del debut de la fibrilación ventricular, los valores representan el promedio de los animales que fallecieron por la fibrilación, los cuales se refieren entre paréntesis en cada grupo. Para el resto de los parámetros se tuvieron en cuenta únicamente los animales que sobrevivieron al infarto, que son los valores de n reportados en cada grupo.

En la Figura 3 se puede apreciar que cinco de los nueve cerdos tratados con el GHRP6 no exhibieron ondas Q patológicas en ninguna de las 12 derivaciones estudiadas. En contraste, las ondas Q de necrosis aparecieron en todos los animales del grupo Placebo+IMA, involucrando mayoritariamente 4 ó 5 derivaciones del ECG. Estos resultados establecieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p < 0,001$).

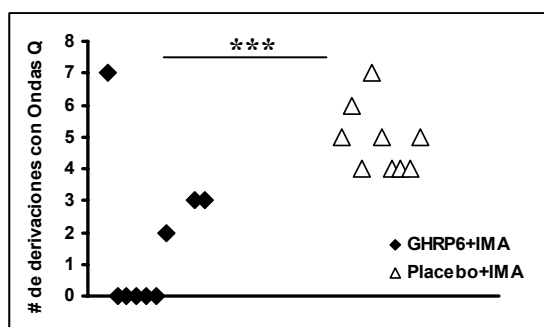


Figura 3. Incidencia de ondas Q en el ECG. En la gráfica aparece representado el número de derivaciones del ECG con ondas Q de necrosis, para cada animal. Los datos fueron analizados por la prueba t para datos no pareados, (***) indica $p < 0,001$ entre los grupos Placebo+IMA vs GHRP6+IMA.

- **Estudio histológico del miocardio.**

El estudio histológico de las biopsias de áreas cercanas al núcleo del infarto, demostró que el GHRP6 favoreció la preservación de la integridad de las fibras miocárdicas y la viabilidad nuclear (Figura 4A); en comparación con el patrón de lisis de las fibras encontrado predominantemente en el grupo Placebo+IMA (Figura 4B). El infiltrado inflamatorio y los eventos hemorrágicos también estaban atenuados en las muestras del grupo GHRP6+IMA. Las penínsulas necróticas del miocardio y la cantidad de núcleos dañados letalmente disminuyeron significativamente (ambos $p < 0,001$) en los animales tratados con el GHRP6, en comparación con el grupo placebo (Tabla 7).

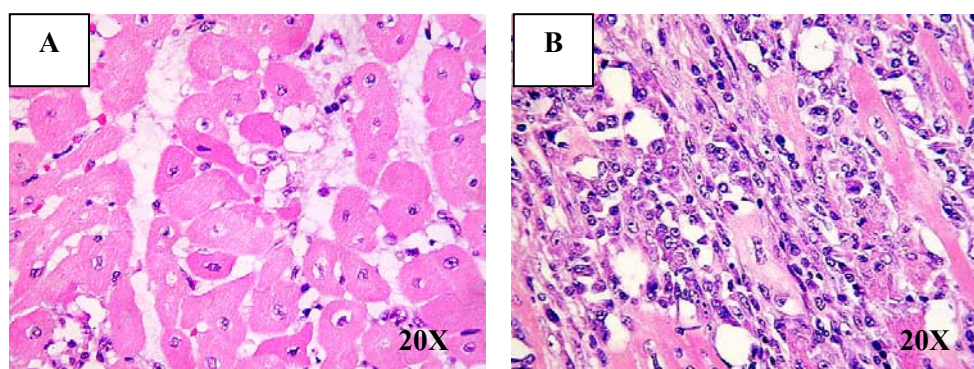


Figura 4. Evaluación histológica del daño inducido por la I/R del miocardio. Imágenes histológicas de zonas adyacentes al núcleo del IMA. (A) Imagen representativa del grupo GHRP6+IMA. (B) Imagen representativa del grupo Placebo+IMA. Nótese el incremento de infiltrado inflamatorio y la disminución de fibras cardíacas de aspecto viable en el grupo placebo.

Tabla 7. Cuantificación microscópica del daño al miocardio.

Parámetros microscópicos	Grupo EBM-IMA (n=8)	Grupo Placebo+IMA (n=9)	Grupo GHRP6+IMA (n=9)
# Penínsulas necróticas	23,4 ± 6,1	25,8 ± 4,3	6,2 ± 2,2 ***
# Núcleos con cambios letales	95,3 ± 18,2	90,1 ± 21,8	27,4 ± 11,6 ***

Los datos se representan como el promedio ± DE por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados; (***) indica $p < 0,001$ para las comparaciones del grupo Placebo+IMA vs GHRP6+IMA. $p > 0,05$ en todas las comparaciones del grupo EBM-IMA vs Placebo+IMA.

- **Efectos del GHRP6 sobre los niveles séricos de CK/MB y CRP.**

Como se muestra en la Figura 5A, en el T1 (30 minutos de reperfusión), se detectó un incremento significativo en los valores en suero de CK/MB del grupo Placebo+IMA, en comparación con el T0 (previo a la cirugía), ($p < 0,01$). En el T2 (72 horas de reperfusión), el incremento observado en el grupo Placebo+IMA fue de cinco veces comparado con los niveles de este grupo en T0 y T1 ($p < 0,001$). En la Figura 5A también se observa que el grupo de EBM-IMA se comportó de forma similar al grupo Placebo+IMA. En contraste, los valores de CK/MB en el grupo GHRP6+IMA no resultaron estadísticamente diferentes al comparar los datos de los T0 y T1 entre sí ($p = 1$). En el muestreo del T2, se detectó un incremento de dos veces en la concentración de CK/MB en el suero de los cerdos tratados con el péptido, en comparación con los valores en T0 y T1 ($p < 0,01$). El análisis de los resultados obtenidos en el punto de muestreo T2 indicaron que el tratamiento con el GHRP6 inhibió el incremento en los niveles de CK/MB en aproximadamente un 70%, en comparación con el grupo Placebo ($p < 0,001$).

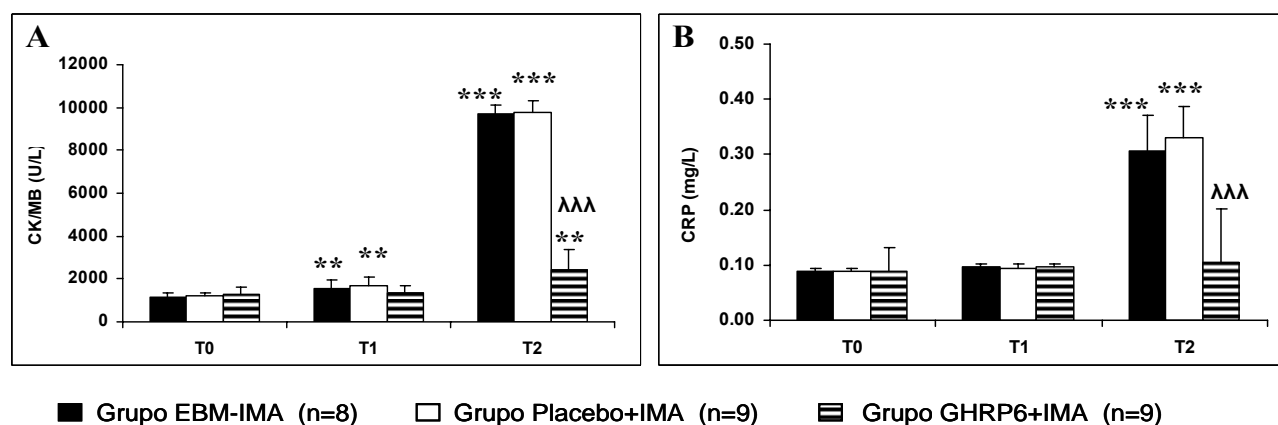


Figura 5. Valores séricos de CK/MB y CRP en el modelo porcino de IMA. Los datos se representan como el promedio \pm DE para cada grupo experimental. **(A)** Niveles séricos de la enzima creatina quinasa, isoforma MB (CK/MB). **(B)** Niveles séricos de la proteína c reactiva (CRP). Las muestras de suero fueron colectadas en tres momentos diferentes: T0, antes de la cirugía; T1, 30 minutos después de iniciada la reperfusión; T2, al finalizar las 72 horas de reperfusión. Los asteriscos indican la significación estadística obtenida en las comparaciones realizadas por la prueba t para datos pareados entre los T1 y T2 vs T0, de cada grupo experimental. (**) Indica $p < 0,01$. (***) Indica $p < 0,001$. Los símbolos de lambda indican la significación obtenida para el grupo GHRP6+IMA, en el T2, al comparar con el grupo Placebo+IMA por la prueba t para datos no pareados. (λλλ) Indica $p < 0,001$.

Por su parte, como se observa en la Figura 5B, los niveles de CRP circulantes permanecieron estables en el T1 comparado con el T0, en todos los grupos del estudio ($p > 0,05$ para todas las comparaciones). Los mayores niveles de CRP fueron detectados en el T2, comparado con los

valores del T0 y del T1, en los grupos EBM-IMA y Placebo+IMA ($p < 0,001$). En contraste, no se observaron diferencias significativas en los valores de CRP en el T2 comparado con T0 y T1, en el caso de los animales tratados con el GHRP6 ($p = 0,2973$; $p = 0,0515$; respectivamente). Esto indica que la administración del GHRP6 atenuó significativamente el incremento en los niveles de CRP circulantes en los animales infartados; de tal forma que en ninguno de los puntos de evaluación el valor de CRP en los animales del grupo GHRP6+IMA resultó estadísticamente diferente de los niveles previos al infarto.

- **Influencia del GHRP6 sobre el estrés oxidativo del miocardio.**

Los resultados de la evaluación en el miocardio de los parámetros indicativos del estrés oxidativo se muestran en la Figura 6. Los niveles de HPT y MDA intramiocárdicos (Figuras 6A y 6B) se elevaron más de 9 y 16 veces, respectivamente, en el grupo Placebo+IMA, en comparación con los Controles Sanos (ambos $p < 0,001$). En los animales del grupo GHRP6+IMA se detectaron valores inferiores de HPT y MDA, en comparación con el grupo Placebo+IMA (ambos $p < 0,001$); aunque, en el caso particular de MDA, fueron también superiores a los detectados en los Controles Sanos.

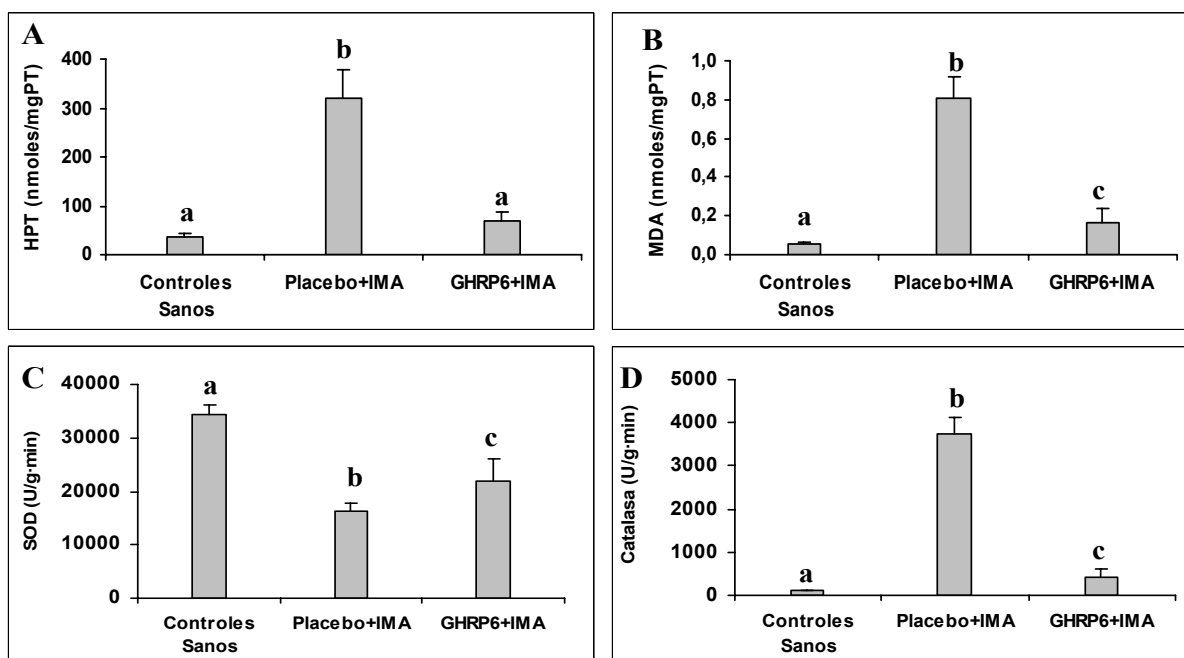


Figura 6. Evaluación del estrés oxidativo en el miocardio de los cerdos. Los valores se representan como el promedio \pm DE por grupo experimental, con $n=5$ cerdos para el grupo Controles Sanos; y $n=9$ cerdos para los grupos Placebo+IMA y GHRP6+IMA. (A) HPT: Hidroperóxidos totales. (B) MDA: Malondialdehído. (C) SOD: Superóxido Dismutasa. (D) Catalasa. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Con respecto a la actividad de la SOD (Figura 6C), se apreció una disminución de más del 50% en los corazones del grupo Placebo+IMA, en comparación con los corazones de los Controles Sanos ($p < 0,001$). Los valores de SOD en el grupo GHRP6+IMA fueron significativamente superiores al grupo placebo ($p < 0,01$), aunque permanecieron inferiores con respecto al grupo Controles Sanos. Por último, en los animales tratados con el GHRP6 se detectó un aumento significativo en la actividad de la enzima Catalasa (Figura 6D) con relación a los animales sanos ($p < 0,05$), aunque inferior al incremento detectado en los animales del grupo placebo.

- **Efectos del GHRP6 en la expresión transcripcional miocárdica del gen IGF-1.**

En la Figura 7 se muestra el resultado de los cinco productos individuales de RT-PCR obtenidos por grupo experimental. Los niveles de expresión de IGF-1 se normalizaron para cada animal con respecto a la expresión del gen constitutivo β -actina. En la gráfica de la Figura 7 se observa la diferencia significativa detectada en los niveles de expresión en el miocardio de IGF-1, cuando se compararon las muestras provenientes de los animales Controles Sanos con los corazones infartados; tanto del grupo placebo como del grupo tratado con el péptido ($p = 0,014$; $p = 0,016$; respectivamente). Sin embargo, cuando los grupos Placebo+IMA y GHRP6+IMA se compararon entre sí, no se observaron diferencias significativas ($p = 0,5476$).

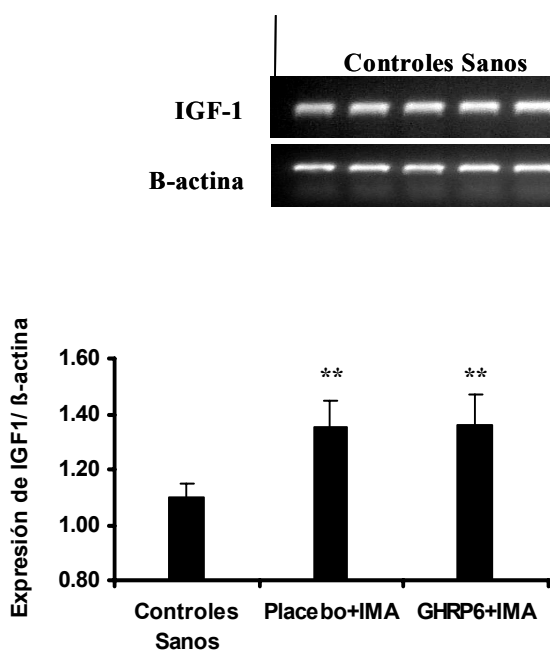


Figura 7. Expresión transcripcional del gen IGF-1 en el miocardio de los cerdos. El panel superior de la figura muestra las bandas del RT-PCR en un gel de electroforesis. En el gráfico se muestran los resultados de la cuantificación por densitometría de la expresión de IGF1, normalizada con respecto al gen β -actina. Los datos se expresan como el promedio \pm DE de las cinco muestras procesadas por cada grupo experimental. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados. (**) Indica $p < 0,01$ para los grupos Placebo+IMA y GHRP6+IMA, en comparación con los cerdos Controles Sanos.

IV.2 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en la prevención y reversión de la Miocardiopatía Dilatada inducida por la administración de Doxorubicina en ratas

IV.2.1 Estudio por ecocardiografía del miocardio.

Durante la fase de prevención de la MCD, la evaluación ecocardiográfica seriada de los animales permitió seguir el curso del efecto tóxico de la DX en el miocardio. Como se muestra en las Figuras 8A a 8F, a partir del día 24 de experimentación se detectó en los animales del grupo DX+Placebo, en comparación con los valores basales, un incremento significativo en el diámetro sistólico del VI ($p=0,0279$), así como un afinamiento notable del septum y de la pared posterior en la sístole (al menos $p<0,05$). El incremento en el diámetro diastólico del VI en los animales del grupo DX+Placebo, en comparación con los valores basales, se hizo evidente a partir del día 37 del estudio ($p<0,0001$); al igual que el afinamiento del septum y de la pared posterior en la diástole (ambos $p<0,0001$). Estas modificaciones estructurales se tradujeron en una disminución significativa del porcentaje de fracción de eyección del grupo DX+Placebo, en comparación con el valor basal ($p=0,0095$), a partir del día 24 del estudio (Figura 8H). Además, estas alteraciones se agudizaron con el aumento de las dosis del cardiotoxico, alcanzándose en el día 52 una caída promedio de la función cardiovascular del 30%, asociada a una remodelación casi total del miocardio en los animales del grupo DX+Placebo (Figuras 8G y 8H).

En cambio, los animales que además de la DX recibieron el tratamiento concomitante con el GHRP6, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus diámetros diastólicos y sistólicos del VI, en comparación con los animales Controles Sanos, en ninguno de los días de evaluación ecocardiográfica del estudio (en todos los casos $p>0,05$) (Figura 8A y 8B). Independientemente de la dosis acumulada de la DX, la administración concomitante del GHRP6 logró prevenir la dilatación del VI. Además, en el grupo DX+GHRP6 no se detectaron valores de afinamiento severo de la pared posterior o del septum, ni en la diástole ni en la sístole; sino que los grosores de ambas paredes del VI permanecieron prácticamente iguales a los valores del grupo Controles Sanos en todos los días de evaluación (en todos los casos $p>0,05$) (Figuras 8C a 8F). Consecuentemente con el hecho de que los animales tratados con el GHRP6 no sufrieron el proceso de remodelado asociado a la administración de la DX (Figura 8G), no se afectaron tampoco en su función cardiovascular, medida en términos de porcentaje de fracción de eyección del VI; la cual se mantuvo en el rango de los valores fisiológicos durante todo el período de evaluación (Figura 8H).

Para la fase de reversión de la MCD, los animales intoxicados con la DX se evaluaron por ecocardiografía para conformar dos grupos correctamente balanceados. Como se puede apreciar en las gráficas de la Figura 9, en el punto de 0 dosis, que corresponde con el inicio de la fase de reversión después de 52 días de administración de la DX, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos Placebo y GHRP6 en ninguno de los parámetros evaluados (en todos los casos $p > 0,05$). Esto indica que la distribución de los animales en ambos grupos fue correcta. En las gráficas de la Figura 9A a la 9F se puede observar además, que los animales de ambos grupos, Placebo y GHRP6, presentaron un incremento significativo de los diámetros del ventrículo izquierdo, así como un afinamiento de las paredes del músculo en el punto de 0 dosis, en comparación con los valores basales (al menos $p < 0,05$). Estas modificaciones estructurales manifestadas íntegramente como la remodelación del miocardio (Figura 9G), unido a la caída de la fracción de eyección detectada, también cercana al 30% (Figura 9H), indican que los animales de los grupos GHRP6 y Placebo iniciaron la fase de reversión con una afectación miocárdica muy similar entre sí.

La reversión de la MCD se evaluó luego de 10 y 20 dosis administradas de los tratamientos. Como podemos observar en las Figuras 9A y 9B, el péptido favoreció la disminución de los diámetros del VI, de forma más efectiva que lo ocurrido espontáneamente en los animales del grupo Placebo. Los valores de los diámetros diastólico y sistólico alcanzados con las 20 dosis de GHRP6 no se diferenciaron de los animales sanos ($p = 0,0709$; $p = 0,5863$); mientras que para el grupo Placebo se mantuvo la dilatación en ambos diámetros ($p = 0,0003$; $p < 0,0001$). En el grupo GHRP6 se observó también una recuperación más efectiva de los grosores de las paredes del ventrículo izquierdo, fundamentalmente en la sístole, en comparación con el grupo Placebo (Figuras 9C a la 9F). Estos resultados se pueden observar de forma más integral en el Índice de Remodelado del VI, donde el tratamiento con 20 dosis del GHRP6 redujo el remodelado inicial de los animales a valores que no se diferenciaron de los Controles Sanos ($p = 0,0964$), lo cual resultó estadísticamente diferente del grupo Placebo ($p = 0,0051$) (Figura 9G). Las mejoras en los parámetros estructurales observadas por ecocardiografía en los animales del grupo GHRP6, se tradujeron igualmente en mejoras funcionales. Esto se demostró con la recuperación del porcentaje de fracción de eyección del VI observada en las ratas tratadas con el péptido (Figura 9H), alcanzándose los valores fisiológicos con las 20 dosis ($p = 0,2977$); mientras que, en el grupo Placebo la recuperación de la función cardíaca fue más lenta y nunca alcanzó los valores del grupo Controles Sanos ($p < 0,0001$).

IV.2.2 Resultados del estudio histológico del miocardio.

En las Figuras 10A y 10B se observa el aspecto histológico normal de ambos ventrículos del miocardio de las ratas. La administración de la DX provocó daños severos en la estructura del músculo cardiaco de los animales del grupo placebo, que incluyeron afinamiento, ondulaciones, fracturas y hasta pérdida de las fibras cardiacas (Figuras 10C y 10D). Prácticamente el 100% de las miofibrillas de los animales tratados con placebo, en ambas fases del estudio, presentaban alguna forma de daño; lo cual afectó severamente la integridad de la pared ventricular (Figuras 11A y 11B). En cambio, en las ratas del grupo DX+GHRP6, de la fase de prevención de la enfermedad, la afectación estructural del miocardio fue muy leve; de forma tal que prácticamente no hubo diferencias con los animales intactos (Figuras 10E y 10F). Los resultados histológicos cuantitativos también demostraron la atenuación del daño cardiaco inducido por el péptido (Figuras 11A y 11B). Del porcentaje de miofibrillas dañadas en los animales tratados de forma concomitante con el GHRP6, muy pocas presentaron ondulaciones y fracturas, que son las formas más severas del daño ocasionado por la DX. En la fase de reversión de la MCD, sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento terapéutico por 15 días con el GHRP6, mostraron igual grado de daño histológico en ambos ventrículos que lo observado en el grupo Placebo (Figuras 10G, 10H, 11A y 11B).

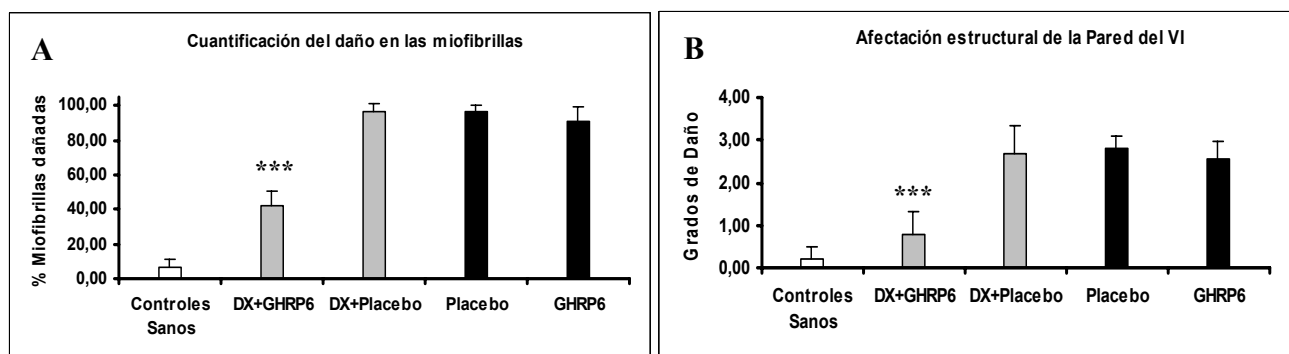


Figura 11. Cuantificaciones histológicas del daño inducido por la DX al miocardio. Los datos se expresan como el promedio \pm DE para cada grupo experimental, $n=12$ en todos los casos. Las barras grises representan los grupos experimentales de la fase de prevención, mientras que las barras negras representan los grupos de la fase de reversión. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados. En ambos casos (***) indica $p<0,0001$ en las comparaciones del grupo DX+Placebo vs DX+GHRP6, de la fase de prevención de la MCD.

IV.2.3 Efectos del GHRP6 sobre el peso corporal y el índice de peso de varios órganos.

Como se observa en la Tabla 8, los animales de los grupos DX+GHRP6 y DX+Placebo no se diferenciaron entre sí en el peso corporal ($p=0,1943$) al finalizar la fase de prevención de la MCD.

En ambos grupos de tratamiento se detectó una caída importante del peso en comparación con los animales sanos ($p < 0,0001$ en ambos casos), indicativo del fenómeno de caquexia, asociado extensivamente a la administración de la DX; el cual no fue prevenido con la administración del GHRP6. Los animales del grupo DX+Placebo mostraron también un incremento significativo del índice de peso relativo del miocardio, los pulmones y el hígado en comparación con los animales del grupo Controles Sanos (Tabla 8). Sin embargo, en los animales del grupo DX+GHRP6, el tratamiento aplicado de forma concomitante atenuó el incremento en los índices de pesos relativos de los órganos.

Tabla 8. Peso corporal de las ratas e índice de peso relativo de los órganos evaluados.

Grupos	Peso Corporal	I.P. Corazón	I.P. Pulmones	I.P. Hígado
Controles Sanos	417,2 ± 27,2 (a)	0,28 ± 0,03 (a)	0,41 ± 0,07 (a)	3,54 ± 0,33 (a)
DX+Placebo	266,6 ± 32,5 (b)	0,51 ± 0,08 (b)	1,02 ± 0,28 (b)	6,79 ± 0,33 (b)
DX+GHRP6	295,5 ± 45,1 (b)	0,33 ± 0,05 (a)	0,62 ± 0,16 (a)	4,96 ± 0,51 (c)

Todos los valores se representan como el promedio ± DE por grupo experimental, n=12 ratas en cada caso. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$. I.P: Índice de peso relativo de los órganos.

IV.2.4 Resultados del estudio histológico en órganos extra-cardiacos.

Durante la observación histológica de los pulmones y el hígado de los animales del grupo DX+Placebo, se detectaron cambios histológicos relacionados con el síndrome de Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC), que son mostrados en la Figura 12. Entre éstos se destacan los fenómenos de congestión pasiva pulmonar y hepática asociados a la retención de sangre venosa en ambos órganos. Estas observaciones o hallazgos histológicos pueden explicar el incremento en el índice de peso relativo de los órganos de las ratas que recibieron el placebo. Los animales del grupo DX+Placebo alcanzaron un valor promedio significativamente superior al del grupo DX+GHRP6 en la escala empleada para cuantificar la congestión pasiva hepática ($2,75 \pm 0,27$ vs $0,69 \pm 0,59$; $p < 0,0001$) (Figuras 12A y 12B). La congestión septal pulmonar que se detectó de forma marcada en el grupo DX+Placebo estaba asociada tanto al engrosamiento como a la hiper celularidad del septo pulmonar, mediada principalmente por el infiltrado inflamatorio. Estos patrones de daño se encontraron marcadamente atenuados en el grupo DX+GHRP6 (Figuras 12C a 12F).

Además de la distensión sinusoidal, la administración del citostático provocó otras formas de daño en el tejido hepático de los animales del grupo DX+Placebo. Uno de los daños principales fue la aparición de focos de necrosis en el parénquima hepático. Los niveles séricos de ALAT del grupo DX+Placebo, evaluados al finalizar el período de intoxicación con la DX, fueron significativamente superiores a los del grupo DX+GHRP6 ($81,38 \pm 12,73$ vs. $29,38 \pm 5,80$; $p < 0,0001$); indicando mayor magnitud en la necrosis hepatocitaria. La reacción fibrótica periportal fue otro de los cambios hepáticos producidos por la administración de la DX (Figura 13A). La administración del GHRP6 previno también esta alteración (Figura 13B).

La DX provocó también severos daños en el epitelio absortivo de los túbulos renales (Figura 13C). La cuantificación realizada en el grupo DX+Placebo indicó que el $78,41 \pm 12,43$ % de los túbulos renales evaluados presentaban daños epiteliales irreversibles. En cambio, en el grupo DX+GHRP6 solamente se detectó el $20,53 \pm 7,20$ % de los túbulos dañados de forma irreversible ($p < 0,0001$); indicando el efecto protector renal del péptido (Figura 13D). El epitelio bronco alveolar de los pulmones también resultó severamente dañado por la antraciclina (Figura 13E), observándose un patrón de necrosis coagulativa epitelial en el $70,95 \pm 14,82$ % de los bronquios evaluados del grupo DX+Placebo. En cambio, en los animales del grupo DX+GHRP6 se observó una significativa reducción en el porcentaje de bronquios dañados ($42,98 \pm 11,50$ %; $p = 0,0098$) (Figura 13F).

IV.2.5 Efectos del GHRP6 en la sobrevivida.

La mortalidad acontecida en ambas fases del estudio fue registrada. La aplicación del tratamiento con el GHRP6, tanto en el esquema concomitante como terapéutico, incrementó significativamente la sobrevivida de los animales con MCD (Figura 14).

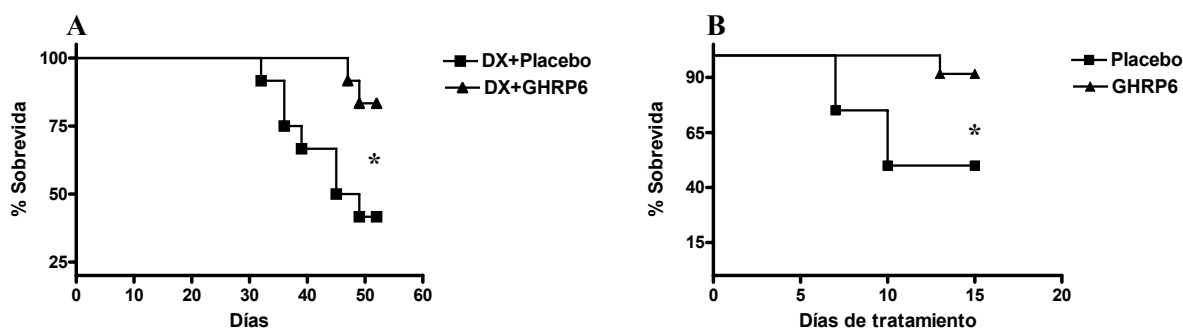


Figura 14. Curvas de sobrevivida de ambas fases del estudio de MCD inducida por DX en ratas. Todos los grupos experimentales iniciaron el estudio con $n=12$ ratas por grupo. Los análisis estadísticos se realizaron empleando la prueba de Logrank. **(A)** Resultados de sobrevivida en la fase de prevención de la MCD, (*) Indica $p=0,0230$. **(B)** Resultados de sobrevivida en la fase de reversión de la MCD, (*) Indica $p=0,0214$.

IV.2.6 Influencia del GHRP6 sobre los marcadores del estado redox celular.

En la Figura 15 se representan los resultados de los marcadores del balance redox ensayados en el suero de los animales de la fase de prevención de la MCD, en diferentes puntos de evaluación. Como se muestra en las Figuras 15A y 15B, el incremento en la dosis acumulada de DX provocó un aumento, cada vez mayor, en las concentraciones de HPT y MDA del grupo DX+Placebo. Este aumento resultó significativamente superior al producido en el grupo DX+GHRP6, para ambos parámetros, tanto en el día 35 (HPT: $p=0,0005$; MDA: $p=0,0125$); como en el día 52 (HPT: $p<0,0001$; MDA: $p=0,0043$).

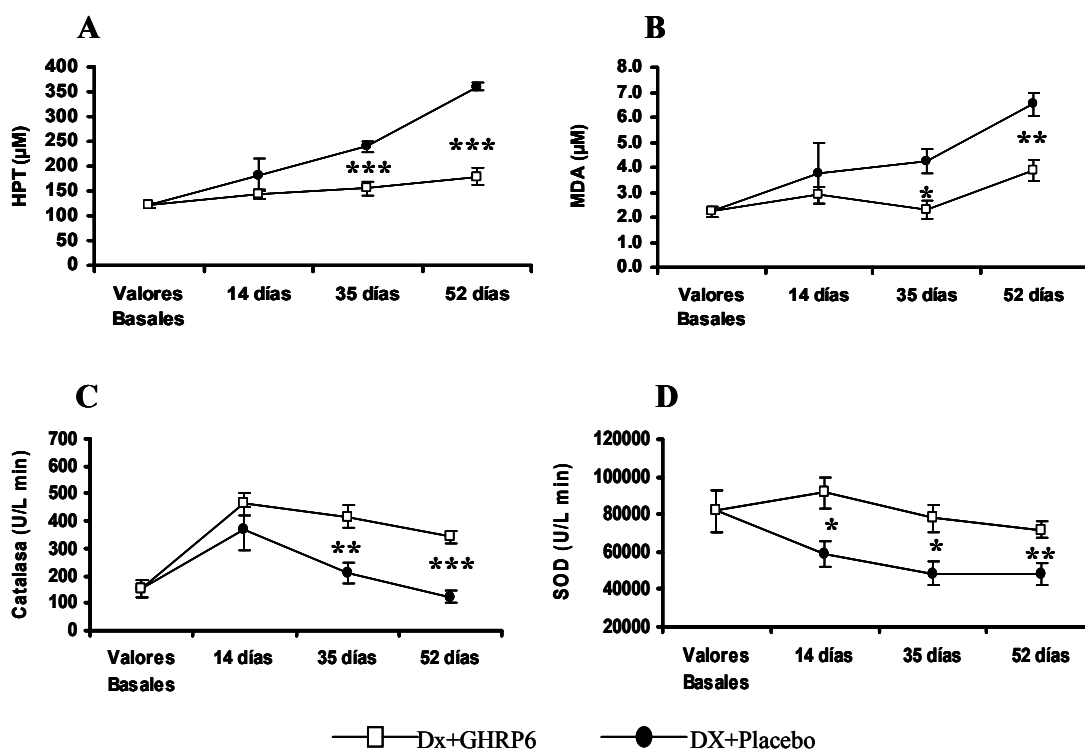


Figura 15. Evaluación del estrés oxidativo en el suero de las ratas del modelo de Miocardiopatía Dilatada. (A) HPT: Hidroperóxidos totales. (B) MDA: Malondialdehído. (C) Catalasa. (D) SOD: Superóxido Dismutasa. Los valores se representan como el Promedio \pm EEM por grupo experimental. Los Valores Basales corresponden al grupo Controles Sanos al inicio del experimento ($n=12$). En los días 14 y 35, $n=12$ para ambos grupos. Los datos del día 52 corresponden a $n=8$ para el grupo DX+Placebo y $n=12$ para el grupo DX+GHRP6. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados. Los asteriscos indican la significación estadística entre los grupos DX+Placebo vs DX+GHRP6 en los diferentes días de evaluación. (*) Indica $p<0,05$. (**) Indica $p<0,01$. (***) Indica $p<0,001$.

Los resultados obtenidos muestran un comportamiento bifásico para la enzima Catalasa (Figura 15C). En los primeros 14 días de administración de la DX, la actividad de esta enzima aumentó significativamente en ambos grupos, DX+GHRP6 ($p=0,0159$) y DX+Placebo ($p=0,0286$), con

respecto a los valores basales. Sin embargo, al alcanzarse en los animales dosis acumuladas cada vez mayores de la DX, la Catalasa sufrió una inhibición importante de su actividad, que fue más marcada en los animales del grupo placebo que en los tratados con el péptido, tanto en el día 35 ($p=0,0056$) como en el día 52 ($p=0,0005$). Por su parte, la actividad total de la enzima SOD del suero de los animales del grupo DX+Placebo disminuyó paulatinamente, en la medida en que fue aumentando la dosis acumulada de la DX (Figura 15D). En cambio, en el grupo tratado de forma concomitante con el GHRP6, la actividad de la enzima SOD fue significativamente superior al grupo placebo en todos los tiempos evaluados (día 14: $p=0,0233$; día 35: $p=0,0134$; día 52: $p=0,0069$). Este resultado indica que en el grupo DX+GHRP6, la inhibición de la SOD inducida por la DX fue atenuada por el tratamiento aplicado.

IV.2.7 Efectos del GHRP6 en la expresión transcripcional miocárdica de los genes *Bcl-2* y *Bax*.

La evaluación de la expresión transcripcional de los genes *Bcl-2* y *Bax* se realizó en muestras de tejido cardíaco de cinco animales de los grupos DX+Placebo, DX+GHRP6 y Controles Sanos (Figura 16A). Como se aprecia en la Figura 16B, la administración concomitante de GHRP6 incrementó significativamente la expresión del gen *Bcl-2* en el miocardio de las ratas, en comparación con los Controles Sanos y los que recibieron el placebo (en ambos casos $p<0,001$).

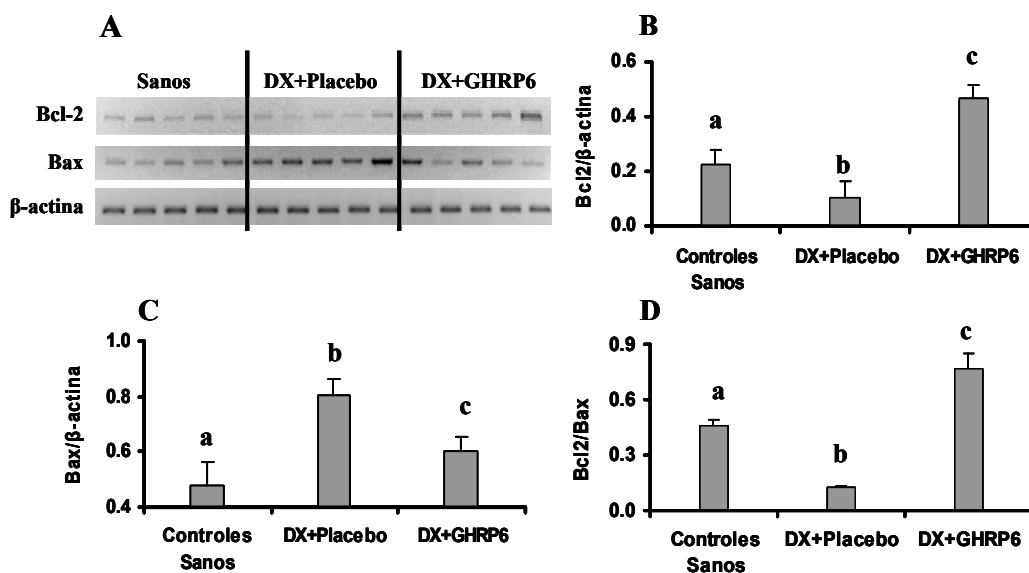


Figura 16. Evaluación de la expresión transcripcional de *Bcl-2* y *Bax* en el miocardio. (A) Bandas obtenidas por la técnica de RT-PCR. Los resultados de expresión normalizados con respecto a la expresión del gen β -actina se muestran en las gráficas: (B) *Bcl-2*; (C) *Bax*; (D) Relación *Bcl-2*/*Bax*. Las barras indican el valor promedio \pm DE por grupo, $n=5$ en cada caso. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Uno de los efectos de la DX fue incrementar la expresión miocárdica del gen Bax en el grupo DX+Placebo, en comparación con los Controles Sanos ($p < 0,001$); lo cual fue significativamente atenuado en el grupo DX+GHRP6 ($p < 0,001$) (Figura 16C). En conjunto, estos resultados favorecieron positivamente la relación de expresión de los genes Bcl-2/Bax en los animales tratados concomitantemente con el GHRP6, en comparación con el grupo placebo ($p < 0,001$) (Figura 16D).

IV.2.8 Estudio del miocardio por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las microfotografías obtenidas del miocardio indicaron que la administración prolongada de la DX provocó la vacuolización del sarcolema y de las mitocondrias, lo cual afectó a las miofibrillas y provocó la pérdida de las crestas mitocondriales, respectivamente. Otras afectaciones ultra-estructurales se detectaron en las uniones o nexos entre las fibras cardíacas. En la Figura 17A se muestra la imagen ultra-estructural del miocardio de animales sanos. En contraste, en la Figura 17B se observan muchos de los cambios patológicos mencionados anteriormente. El desarreglo de la unidad contráctil cardíaca se hace evidente al comparar los animales tratados con DX y los animales sanos. En el grupo tratado terapéuticamente con el GHRP6 por 15 días, a pesar de que los animales recuperaron la función cardiovascular, se observan también las alteraciones de las miofibrillas, de las uniones entre fibras, así como los daños mitocondriales severos. Sin embargo, es de destacar que, en este grupo de animales que revirtieron satisfactoriamente la MCD, mediante el tratamiento con el GHRP6, se observó un mayor número de mitocondrias de aspecto viable (Figura 17C).

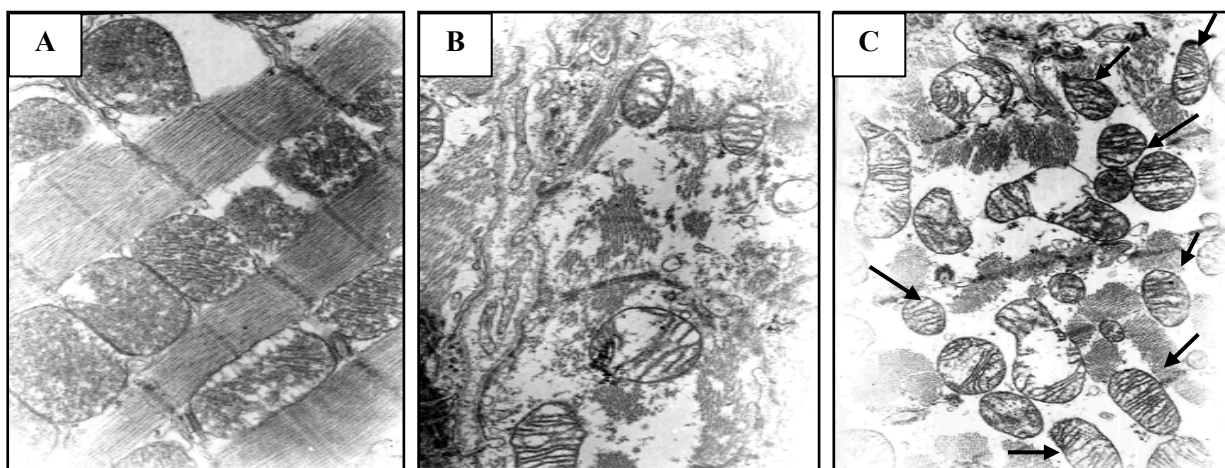


Figura 17. Estudio por MET del miocardio de animales de la fase de reversión de la MCD. (A) Imagen de la ultra-estructura normal del miocardio de rata. (B) Imagen representativa del grupo Placebo. (C) Imagen representativa del grupo de ratas tratadas con GHRP6. Nótese el incremento en mitocondrias de aspecto viable, indicadas por las flechas, en la imagen C.

IV.3 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en un modelo experimental de Isquemia/Reperusión hepática y Daño Múltiple de Órganos

IV.3.1 Resultados histológicos en el hígado.

La I/R provocó daños severos en la arquitectura del tejido hepático del grupo Placebo+I/R, que incluyeron la aparición de áreas de necrosis coagulativa, hemorragias, balonamiento citoplasmático y una marcada distensión sinusoidal. También observamos daño nuclear irreversible, hipertrofia de las células de Kupffer e infiltración de neutrófilos en los animales que recibieron el placebo. Algunos de estos cambios se muestran en las Figuras 18A-18C. Ninguno de los daños descritos anteriormente se detectaron en los animales del grupo Simulador (Figura 18D). La administración profiláctica del GHRP6 atenuó la extensión e intensidad del daño en el parénquima hepático. Tanto los focos necróticos como las hemorragias se redujeron drásticamente en los animales tratados con el péptido, en los cuales el daño predominante fue el balonamiento citoplasmático de los hepatocitos (Figuras 18E y 18F). El 90% de los animales del grupo GHRP6+I/R alcanzaron grados inferiores a 2 en la escala de Suzuki, mientras que el 100% de los animales del grupo Placebo+I/R alcanzaron grado 3 ó 4 de severidad del daño hepático ($p < 0,001$) (Figura 19A).

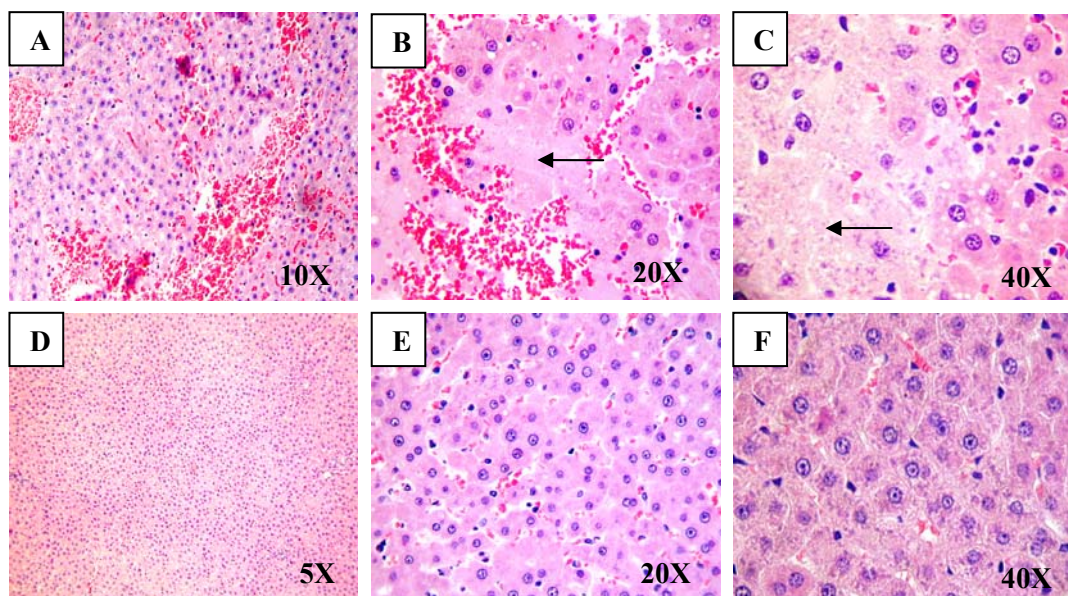


Figura 18. Imágenes representativas del daño hepático inducido por el episodio de I/R. El panel superior (imágenes A, B, C) corresponden al grupo Placebo+IR. En estas se observan, consecutivamente, las hemorragias, zonas de necrosis (indicadas por flechas) y daños nucleares irreversibles presentes en este grupo. En el panel inferior, la imagen D corresponde al grupo Simulador mientras que las imágenes E y F corresponden al grupo GHRP6+I/R. Nótese la atenuación de la hemorragia y la apariencia prácticamente normal del parénquima hepático en los animales tratados con el GHRP6, en comparación con el placebo.

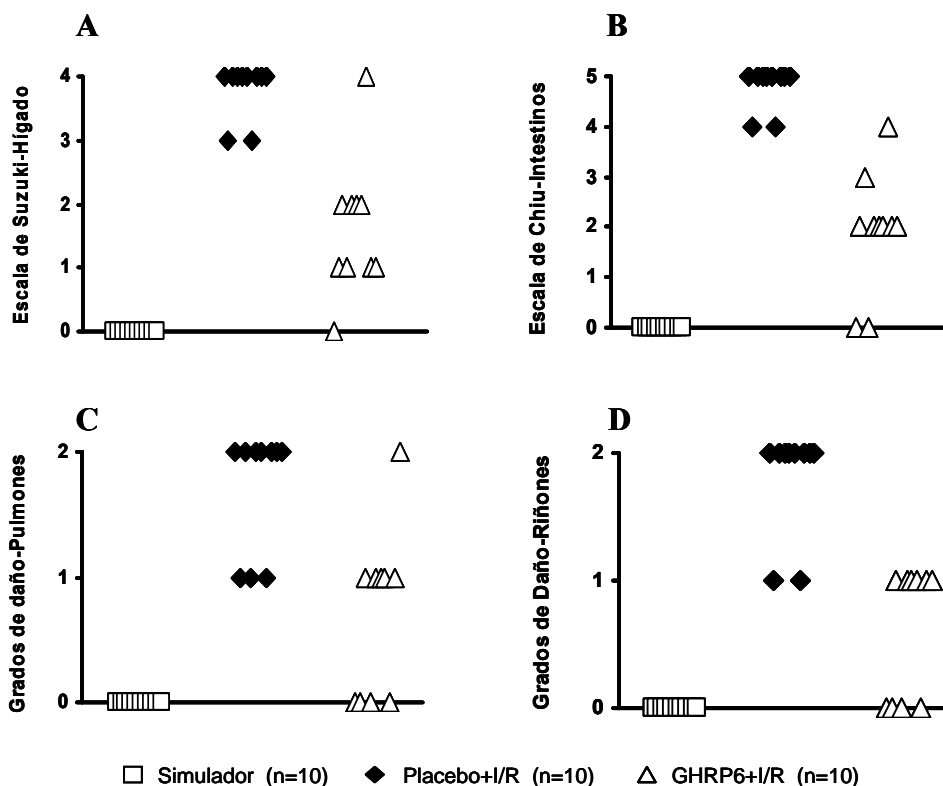


Figura 19. Evaluación histológica del daño inducido por la I/R en diferentes órganos. En las gráficas se representa la puntuación otorgada a cada animal, de acuerdo a las escalas utilizadas para semicuantificar el daño inducido por la I/R hepática en los diferentes órganos: (A) Hígado, (B) Intestinos, (C) Pulmones, (D) Riñones.

IV.3.2 Evaluaciones histológicas en órganos remotos al sitio de la Isquemia/Reperusión.

La I/R hepática provocó daños macroscópicos severos en el 73 ± 4 % de la longitud del intestino delgado del grupo Placebo+I/R. El tratamiento profiláctico con el GHRP6 disminuyó significativamente el daño a solamente el 27 ± 3 % de promedio de longitud ($p < 0,01$). Las porciones de jejunio distal e íleon proximal fueron las más dañadas durante la fase de reperusión. Los estudios histológicos demostraron que la I/R hepática causó en el intestino delgado: la erosión de las vellosidades, la aparición de infiltrado inflamatorio en la lámina propia, hemorragia focal en el lumen y extensas áreas de infarto de la mucosa. Algunos de estos cambios se muestran en la Figura 20A. Los daños al intestino delgado se atenuaron marcadamente en los animales que recibieron el tratamiento profiláctico con el GHRP6 (Figura 20B). En el grupo Placebo+I/R, el 100% de los animales alcanzaron valores máximos en la escala de Chiu (4 ó 5 puntos), lo cual resultó estadísticamente significativo ($p < 0,001$) con respecto al grupo GHRP6+I/R (Figura 19B).

Como se muestra en la Figura 19C, los pulmones de todos los animales del grupo Placebo+I/R resultaron afectados, de los cuales el 70% exhibió un daño parenquimal muy marcado que recuerda al distrés severo del adulto. Este se caracterizó por el engrosamiento septal, la hiper celularidad, el reclutamiento neutrofílico, la adhesión intersticial y la reducción del espacio luminal de los alvéolos. Algunos de estos cambios se observan en la Figura 20C. El tratamiento profiláctico con el GHRP6 permitió atenuar significativamente los daños pulmonares, de forma tal que solo un animal del grupo GHRP6+I/R (10%) exhibió un patrón de distrés pulmonar severo ($p < 0,05$) (Figuras 19C y 20D).

En los riñones, la I/R afectó fundamentalmente las células del epitelio tubular, provocando daños nucleares irreversibles e incluyendo en muchos casos el desprendimiento de la membrana basal (Figura 20E). Como se muestra en la Figura 19D, el 100% de los animales del grupo Placebo+I/R exhibieron algún grado de daño epitelial renal, mayoritariamente severo e irreversible. Sin embargo, en los animales tratados profilácticamente con el GHRP6, se logró prevenir significativamente el daño tubular ($p < 0,001$) ya que los cambios fueron mayoritariamente reversibles (Figura 20F).

IV.3.3 Determinación de marcadores circulantes del daño hepático y renal.

La I/R incrementó significativamente, más de 10 veces, los niveles séricos de ambas transaminasas en el grupo Placebo+I/R, en comparación con el grupo Simulador (ambas $p < 0,001$). La administración profiláctica del GHRP6 disminuyó en más del 50% los valores de ALAT y ASAT en el grupo GHRP6+I/R, respecto a los animales que recibieron el placebo (ambas $p < 0,01$) (Figura 21).

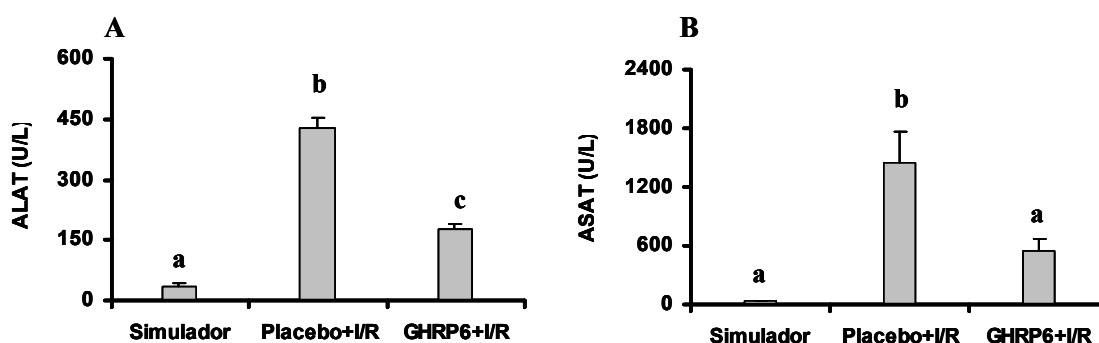


Figura 21. Valores séricos de ALAT y ASAT en el modelo de I/R hepática en ratas. Los datos se representan como el promedio \pm EEM por grupo experimental, con $n=10$ animales en cada caso. **(A)** ALAT. **(B)** ASAT. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En el grupo Placebo+I/R los niveles séricos de creatinina detectados ($72,77 \pm 3,48 \mu\text{mol/L}$) fueron significativamente superiores a los del grupo Simulador ($41,96 \pm 5,98 \mu\text{mol/L}$; $p=0,012$). En cambio, los animales que recibieron el pre-tratamiento con el GHRP6 mostraron tan solo un 30% de incremento en los niveles séricos de creatinina ($55,07 \pm 6,25 \mu\text{mol/L}$), lo cual no resultó estadísticamente diferente del grupo Simulador ($p=0,1616$).

IV.3.4 Influencia del GHRP6 en el estrés oxidativo del hígado sometido a la isquemia.

La I/R incrementó en más de tres veces la concentración hepática de HPT en el grupo Placebo+I/R en comparación con el grupo Simulador ($p<0,001$) (Tabla 9). De forma similar, la concentración hepática de MDA se incrementó en más de cuatro veces en el grupo placebo, con respecto a los animales simuladores de la isquemia ($p<0,001$). El empleo profiláctico del GHRP6 atenuó en un 75% la generación de HPT en el hígado, así como disminuyó en un 50% el incremento de MDA, principal indicador de la peroxidación lipídica, en comparación con el grupo Placebo+I/R (en ambos casos $p<0,001$). Como consecuencia de la I/R, se detectó también un incremento significativo en la actividad de la enzima Catalasa en el grupo Placebo+I/R, en comparación con el grupo Simulador ($p<0,001$) (Tabla 9). En el caso del grupo GHRP6+I/R, la actividad de esta enzima también se incrementó significativamente, aunque en menor medida que en los animales que recibieron el placebo ($p<0,001$). En la Tabla 9 se observa que la actividad total de la enzima SOD se inhibió en aproximadamente un 60% en el grupo Placebo+I/R, en comparación con el grupo Simulador ($p<0,001$). En cambio, en el grupo GHRP6+I/R la actividad total de esta enzima se mantuvo en valores similares a los del grupo Simulador ($p>0,05$). El empleo de cianuro de sodio, un inhibidor selectivo de la actividad de las isoformas SODCu/Zn, permitió evaluar específicamente la isoforma SODMn. Como se puede apreciar en la Tabla 9, la actividad de la SODMn se modificó significativamente con el episodio de I/R, observándose una inhibición de casi el 70% de su actividad en el grupo Placebo+I/R, con respecto al grupo Simulador ($p<0,001$). Sin embargo, la actividad de la isoforma SODMn se preservó en los animales que recibieron el tratamiento con el GHRP6, notándose incluso la tendencia al aumento de su actividad con respecto a los valores basales. La actividad de las isoformas SODCu/Zn no se diferenció de forma significativa entre los grupos sometidos a la I/R y los animales simuladores (todas $p>0,05$). No obstante, debemos destacar que también se observó una tendencia a la inhibición de la actividad de la SODCu/Zn en el grupo Placebo+I/R, con respecto al grupo Simulador; la cual estuvo más atenuada en el grupo GHRP6+I/R.

Tabla 9. Evaluación de parámetros indicadores del estrés oxidativo hepático en las ratas.

Parámetros	Grupo Simulador	Grupo Placebo+I/R	Grupo GHRP6+I/R	Grupo Sanos+GHRP6
HPT (nmoles/mg PT)	29,5 ± 1,2 (a)	100,5 ± 6,5 (b)	51,2 ± 1,7 (c)	24,7 ± 2,9
MDA (nmoles/mg PT)	0,06 ± 0,01 (a)	0,25 ± 0,03 (b)	0,12 ± 0,01 (a)	0,08 ± 0,01
Catalasa (U/g·min)	16,3 ± 3,6 (a)	580,6 ± 57,4 (b)	31,5 ± 4,3 (a)	16,2 ± 3,5
SOD (U/g·min)	18261 ± 1261 (a)	9174 ± 645,9 (b)	18030 ± 498,3 (a)	24986 ± 1535 **
SODMn (U/g·min)	9078 ± 1111 (a)	2868 ± 487,7 (b)	9964 ± 556,8 (a)	13711 ± 1500 *
SODCu/Zn (U/g·min)	9183 ± 783,2 (a)	6306 ± 985,4 (a)	8066 ± 788,1 (a)	11275 ± 946,8

Las determinaciones se realizaron en muestras de homogenado de hígado de las ratas. Los datos se reportan en la tabla como el valor promedio ± el EEM por grupo experimental, con n=10 animales en cada caso. HPT: Hidroperóxidos totales; MDA: Malondialdehído; SOD: Superóxido Dismutasa total; SODMn: Superóxido Dismutasa dependiente de manganeso; SODCu/Zn: Superóxido Dismutasa dependiente de Cu/Zn; PT: Proteínas Totales. Para las comparaciones estadísticas múltiples entre los grupos Simulador, Placebo+I/R y GHRP6+I/R se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los asteriscos reflejan la significación estadística de las comparaciones entre los grupos Simulador y Sanos+GHRP6 realizadas con la prueba t para datos no pareados; (*) indica $p < 0,05$; (**) indica $p < 0,01$.

En este experimento se evaluó también la influencia de una administración única del GHRP6 en animales sanos y conscientes, en un corto período de tiempo, en los parámetros indicadores del estrés oxidativo. Como se muestra en la columna del grupo Sanos+GHRP6 de la Tabla 9, la administración del péptido en condiciones fisiológicas no modificó los niveles de MDA ($p=0,2653$) ni de HPT ($p=0,0673$) con respecto al grupo Simulador. La actividad de la enzima Catalasa tampoco se modificó en condiciones fisiológicas por la administración del GHRP6 ($p=0,9725$). En cambio, la actividad de la isoforma SODMn se incrementó en más del 50% en los animales sanos tratados con el péptido, en comparación con los del grupo Simulador ($p=0,0281$). Igualmente, las isoformas SODCu/Zn mostraron una tendencia a incrementar su actividad cuando los animales sanos se inyectaron con el GHRP6, aunque esta respuesta no fue significativa estadísticamente ($p=0,1137$). En correspondencia, como resultado del aumento de la actividad de la SODMn, principalmente, los animales sanos tratados con el péptido GHRP6 mostraron un incremento significativo en la actividad total de la enzima SOD ($p=0,0057$), uno de los principales miembros del sistema de defensa antioxidante de los seres vivos.

Como se observa en la Figura 22, la I/R incrementó significativamente en el grupo Placebo+I/R la actividad de la enzima MPO en el hígado, y aún en mayor magnitud en los intestinos; en comparación con el grupo Simulador (en ambos casos $p < 0,001$). Los incrementos de la actividad de esta enzima, indicativo de una respuesta inflamatoria en ambos órganos, se atenuaron en las muestras del grupo GHRP6+I/R de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$ en ambos casos).

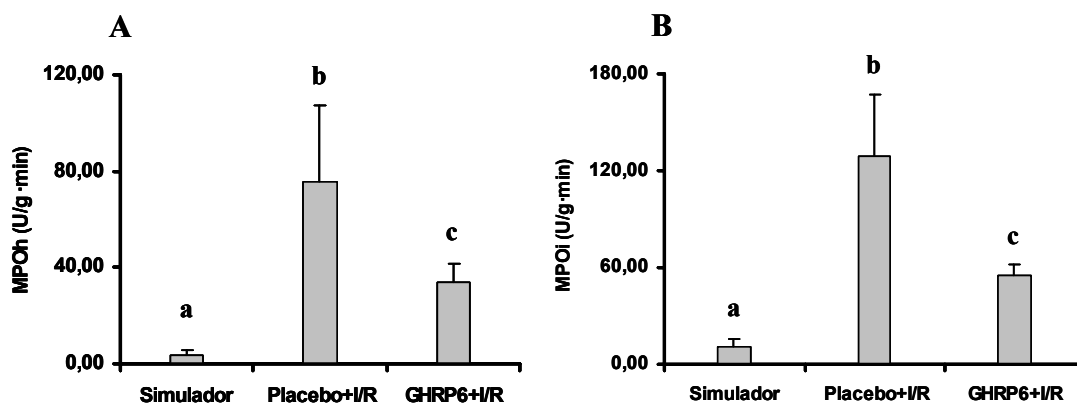


Figura 22. Determinación de la enzima Mieloperoxidasa en los tejidos. (A) MPOh: Mieloperoxidasa en el hígado. (B) MPOi: Mieloperoxidasa en los intestinos. Los valores se representan como el promedio \pm DE por grupo experimental, con $n=10$ animales en cada caso. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

IV.3.5 Evaluación de la expresión transcripcional de los genes HIF-1 α , IGF-1, PI3K y PKB en el hígado.

Empleando la técnica de RT-PCR se evaluó la expresión transcripcional hepática de los factores inductores de sobrevida: HIF-1 α , IGF-1, y las quinasas PI3K/PKB (Figura 23A). Como se puede apreciar en la Figura 23B, el empleo profiláctico del GHRP6 aumentó significativamente la expresión de HIF-1 α en el hígado, al finalizar el período de reperusión, en comparación con el grupo placebo ($p < 0,01$). Los resultados de la amplificación del gen IGF-1 en las muestras de tejido hepático no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales ($p > 0,05$ en todas las comparaciones) (Figura 23C). En el caso de las quinasas PI3K/PKB, el incremento detectado de esta ruta en el grupo GHRP6+I/R fue significativamente superior al inducido por la hipoxia en el grupo Placebo+I/R (al menos $p < 0,05$) (Figuras 23D y 23E).

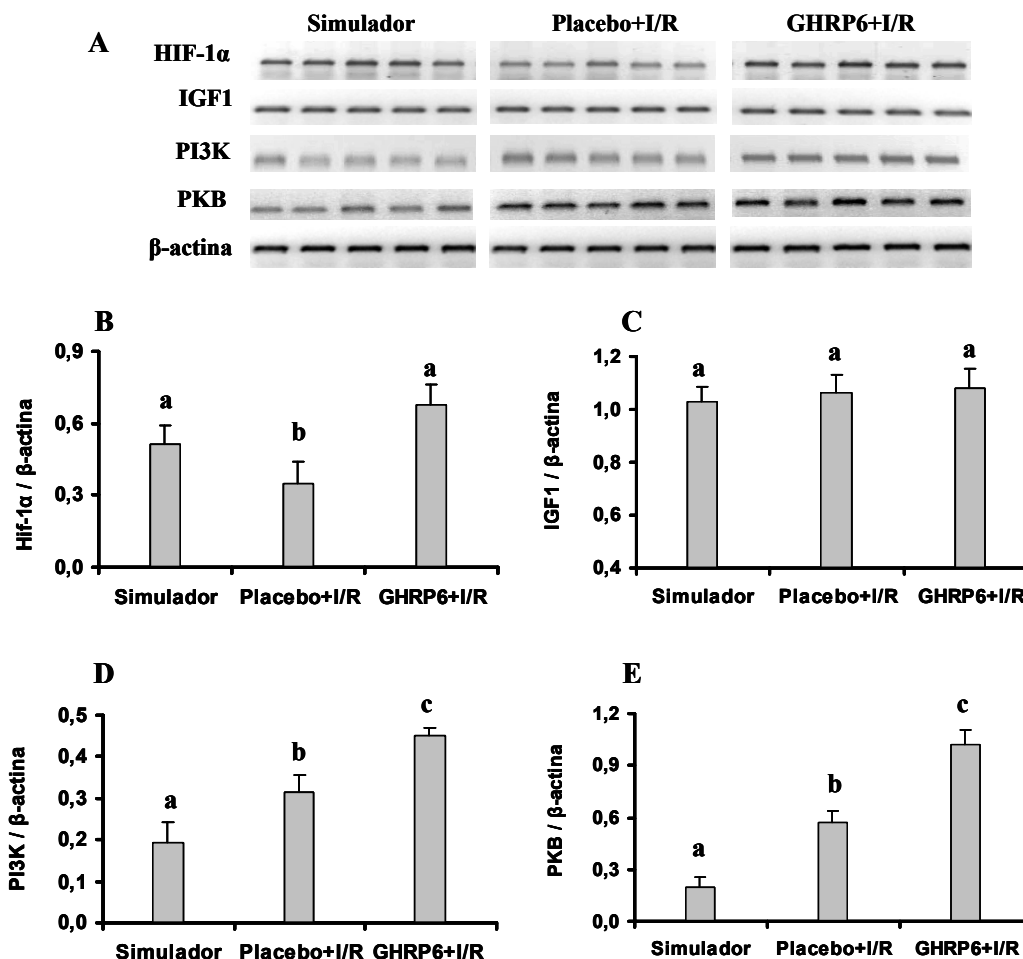


Figura 23. Evaluación de la expresión transcripcional de HIF-1 α , IGF-1, PI3K y PKB en el hígado. (A) Bandas obtenidas por la técnica de RT-PCR. Los resultados de expresión normalizados con respecto a la expresión del gen β -actina se muestran en las gráficas: (B) HIF-1 α ; (C) IGF-1; (D) PI3K; (E) PKB. Las barras representan el valor promedio \pm DE por grupo experimental, con n=5 animales en cada caso. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

IV.4 Caracterización farmacológica del péptido GHRP6 en la prevención y reversión de la Cirrosis Hepática inducida por la administración de CCL₄ en ratas

IV.4.1 Resultados del estudio del hígado por ultrasonido.

La evaluación por ultrasonido que se realizó en el quinto mes del estudio a los grupos CCL₄+GHRP6 y CCL₄+Placebo, de la fase de prevención de la cirrosis, demostró una disminución significativa en el valor de Índice de Fibrosis por Ultrasonido (IFU) del grupo tratado con el péptido, en comparación con los animales que recibieron el placebo ($p=0,0009$) (Tabla 10). En la

fase de reversión de la cirrosis se evaluaron por ultrasonido los grupos GHRP6-60d y Placebo-60d, al concluir el séptimo mes del ensayo. Como se muestra en la Tabla 10, los animales del grupo Placebo-60d alcanzaron el mayor valor de IFU calculado en el estudio, lo que indica una progresión de la enfermedad del quinto al séptimo mes de intoxicación con el CCL₄. Sin embargo, para el grupo GHRP6-60d se detectó una disminución de más del 30% del valor de IFU con respecto al grupo Placebo-60d (p=0,0005).

Tabla 10. Resultados de la evaluación del hígado por ultrasonido.

Grupos	IFU	Diámetro de la Porta (mm)	Animales con ascitis clínica (%)	Animales con ascitis por US (%)
Controles Sanos (n=7)	0	0,71 ± 0,05	0	0
CCL4+GHRP6 (n=12)	2,50 ± 0,30	0,80 ± 0,06	1 (8%)	2 (17%)
CCL4+Placebo (n=12)	5,93 ± 0,79 ***	1,12 ± 0,14 *	5 (42%)	8 (67%) *
GHRP6-60d (n=12)	4,80 ± 0,42	0,96 ± 0,08	0	3 (25%)
Placebo-60d (n=12)	7,00 ± 0,29 ***	1,34 ± 0,13 *	5 (42%) *	8 (67%)

IFU: Índice de Fibrosis por Ultrasonido. US: Ultrasonido. La evaluación por US a los grupos CCL4+GHRP6 y CCL4+Placebo, de la fase de prevención, se realizó al finalizar el quinto mes del ensayo. Los grupos GHRP6-60d y Placebo-60d, de la fase de reversión, se sometieron a la evaluación por US al finalizar el séptimo mes del ensayo. Los valores de diámetro de la porta del grupo Controles Sanos corresponden a la evaluación por US del séptimo mes del experimento. Los datos del IFU y del diámetro de la Porta se representan como el promedio ± EEM por grupo experimental. Las ascitis detectadas por US incluyen las ascitis clínicas. Están representadas solamente las diferencias significativas entre los animales tratados con el GHRP6 y con el placebo de cada fase del experimento. Los valores de IFU y diámetro de la porta se compararon con la prueba t para datos no pareados. Los porcentajes se compararon con la prueba exacta de Fisher. (***) Indica p<0,001; (*) Indica p<0,05.

En el grupo CCL4+Placebo, de la fase de prevención, la enfermedad cirrótica provocó el incremento en aproximadamente un 60% del diámetro de la vena Porta, en comparación con el grupo Controles Sanos (p=0,0052). En cambio, en el grupo CCL4+GHRP6 no se detectó dilatación significativa de la Porta, en comparación con los animales sanos (p=0,2938). Al séptimo mes, en la fase de reversión de la enfermedad, se observó una diferencia significativa entre el grupo Placebo-60d y el grupo GHRP6-60d en cuanto al valor de dilatación de la vena Porta (p= 0,0201), siendo éste superior para el grupo que recibió el placebo (Tabla 10).

Como se muestra en la imagen del Anexo 17, algunos animales llegaron a acumular volúmenes superiores a los 100 mL de líquido ascítico en la cavidad abdominal, lo cual fue macroscópicamente detectable. Sin embargo, los volúmenes muy pequeños de ascitis no pueden ser detectados con

seguridad mediante inspección clínica de los animales. Por tal motivo, se empleó la técnica del ultrasonido para detectar la presencia de cualquier cantidad de líquido en la cavidad abdominal. Como se observa en la Tabla 10, un menor número de animales de los grupos CCL4+GHRP6 y GHRP6-60d desarrollaron ascitis en comparación con los grupos CCL4+Placebo ($p=0,0361$) y Placebo-60d ($p=0,0373$), respectivamente. En el caso de los grupos Placebo-15d y GHRP-15d, no se detectaron ascitis clínicas durante el corto período de tratamiento ensayado.

IV.4.2 Estudios histológicos de los hígados cirróticos.

Las imágenes histológicas provenientes de los grupos CCL4+Placebo, Placebo-15d y Placebo-60d, exhiben gruesos puentes de colágeno en el parénquima hepático, los cuales conforman los llamados nódulos cirróticos (Figuras 24A, 24C y 24E). Los estudios morfométricos realizados, empleando un programa de procesamiento de imágenes digitales, permitieron cuantificar los principales parámetros histológicos relacionados con la cirrosis. De este modo se determinó el grosor de los cordones fibróticos, la cantidad de nódulos cirróticos y de colágeno en los cordones (Anexo 18), así como el porcentaje de fibrosis y grasa presente en el parénquima (Anexo 19).

De acuerdo con el análisis morfométrico realizado, aproximadamente el 17% del área hepática de los animales del grupo CCL4+Placebo, de la fase de prevención, estaba cubierta por material fibrótico (Figura 24A) (Tabla 11). Sin embargo, en el grupo CCL4+GHRP6 se detectó una disminución de más del 85% del depósito de material fibrótico ($p<0,0001$). En correspondencia, los animales del grupo tratado con el péptido mostraron una reducción, de aproximadamente siete veces, tanto en la cantidad de nódulos cirróticos como en el grosor de los cordones, en comparación con el grupo CCL4+Placebo (en ambos casos $p<0,0001$) (Figura 24B).

Los grupos CCL4+Placebo y Placebo-15d no se diferenciaron en el %Fibrosis ($p=0,2267$), el grosor de los cordones ($p=0,9558$) ni en la cantidad de nódulos cirróticos ($p=0,4416$); lo cual indica que la fibrosis no revirtió espontáneamente durante los 15 días en que no se inyectó el CCL₄. La administración terapéutica del GHRP6 por 15 días, en ausencia del agente hepatotóxico, favoreció la reducción del %Fibrosis en un 37% ($p=0,0004$) (Figuras 24C y 24D). Para estos dos grupos, el GHRP6-15d y el Placebo-15d, no se detectaron diferencias significativas en el número de nódulos cirróticos ($p=0,0602$); aunque se observó una tendencia a disminuir con la aplicación del péptido. La reducción del %Fibrosis del grupo GHRP6-15d sí se asoció con la disminución significativa del grosor de los cordones ($p=0,0011$) (Tabla 11). El %Colágeno presente en las áreas de depósito de

material fibrótico disminuyó también significativamente en el grupo GHRP6-15d ($33,4 \pm 26,5$) en comparación con el grupo Placebo-15d ($77,7 \pm 18,6$; $p=0,0007$).

Tabla 11. Análisis morfométricos de la Cirrosis Hepática.

Grupos	Grosor-Cordones (micras)	Nódulos Cirróticos	% Fibrosis	% Grasa
CCL4+GHRP6 (n=12)	$11,0 \pm 1,7$ ***	$8,2 \pm 2,3$ ***	$2,0 \pm 0,3$ ***	$33,0 \pm 2,2$ ***
CCL4+Placebo (n=12)	$72,1 \pm 7,9$	$55,8 \pm 5,2$	$16,8 \pm 0,6$	$15,1 \pm 2,9$
GHRP6-15d (n=10)	$47,3 \pm 4,6$ **	$37,9 \pm 4,1$	$9,8 \pm 1,2$ ***	$7,0 \pm 0,6$ ***
Placebo-15d (n=10)	$71,6 \pm 4,7$	$50,0 \pm 4,4$	$15,6 \pm 0,7$	$13,2 \pm 0,8$
GHRP6-60d (n=12)	$34,6 \pm 4,4$ ***	$22,4 \pm 4,2$ ***	$4,9 \pm 0,7$ ***	$24,7 \pm 1,9$ **
Placebo-60d (n=12)	$102,7 \pm 8,1$	$58,9 \pm 4,3$	$19,4 \pm 0,7$	$17,9 \pm 1,2$

Los datos se presentan como el promedio \pm EEM por grupo experimental. Los asteriscos indican la significación estadística de las comparaciones realizadas con la prueba t para datos no pareados entre los grupos que recibieron el GHRP6 y los respectivos grupos placebo. (**) $p<0,01$; (***) $p<0,001$.

Luego de siete meses de administración del agente hepatotóxico, los animales del grupo Placebo-60d alcanzaron valores superiores de %Fibrosis que el grupo CCL4+Placebo ($p=0,0139$). Esto indica la progresión en la severidad de la enfermedad del quinto al séptimo mes de intoxicación con CCL₄. Dicha progresión no se debió a un incremento de la nodularidad del parénquima ($p=0,8976$) sino al aumento significativo del grosor de los cordones ($p=0,0302$) del quinto al séptimo mes del ensayo (Figura 24E). Como se muestra en la Tabla 11, la administración terapéutica del GHRP6 por 60 días permitió la reducción del 75% del área cubierta por la fibrosis, comparado con el grupo Placebo-60d ($p<0,0001$), a pesar de la continuidad de la intoxicación con el CCL₄ (Figura 24F). Esta regresión de la fibrosis implicó también la reducción significativa del número de nódulos cirróticos y del grosor de los cordones (en ambos casos $p<0,0001$) (Tabla 11).

En relación al depósito de grasa en el hígado, el grupo CCL4+GHRP6 exhibió un incremento significativo en el %Grasa respecto al grupo CCL4+Placebo ($p=0,0002$) (Tabla 11). Para el caso de la intervención terapéutica con el GHRP6, durante 15 días y en ausencia de CCL₄, se observó una reducción del porcentaje de inclusión de grasa en el grupo GHRP6-15d en comparación con el grupo Placebo-15d ($p<0,0001$). Finalmente, en el grupo GHRP6-60d se detectó un 38% de incremento en el depósito de grasa en comparación con el grupo Placebo-60d ($p=0,0067$).

IV.4.3 Marcadores séricos del daño y de la función hepática.

En la fase de prevención de la cirrosis hepática se realizaron dos evaluaciones de los parámetros bioquímicos en el suero de las ratas, al segundo y al quinto mes del ensayo. Como se muestra en la Figuras 25A y 25B, a los dos meses de intoxicación con el CCL₄ los animales del grupo placebo exhibieron los valores más altos detectados de ALAT y ASAT, los cuales fueron significativamente superiores a los del grupo Controles Sanos (en ambos casos $p < 0,001$). A los cinco meses, los niveles de ambas transaminasas en el grupo CCL₄+Placebo fueron inferiores de los detectados a los dos meses, aunque se mantuvieron por encima de los animales sanos ($p < 0,001$). Como se observa en las Figuras 25A y 25B, el curso temporal de los niveles séricos de ALAT y ASAT en el grupo CCL₄+GHRP6 fue muy similar a lo observado para el grupo CCL₄+Placebo. No obstante, en la evaluación correspondiente a los dos meses, los niveles de ambas transaminasas en los animales tratados con el GHRP6 fueron significativamente inferiores de los tratados con el placebo (en ambos casos $p < 0,001$). A los cinco meses, se detectó también una disminución en los valores de ASAT en el grupo CCL₄+GHRP6 en comparación con el grupo CCL₄+Placebo ($p < 0,001$); mientras que para la ALAT, se obtuvieron concentraciones semejantes entre ambos grupos ($p > 0,05$). Los marcadores séricos de la actividad de síntesis del hígado que se evaluaron en esta fase se muestran en las Figuras 25C a 25F. En ambos puntos de evaluación, a los dos y a los cinco meses de intoxicación con el CCL₄, los animales del grupo CCL₄+GHRP6 mantuvieron una actividad de síntesis en el hígado significativamente superior a los animales del grupo CCL₄+Placebo (al menos $p < 0,05$).

En la fase de reversión de la cirrosis hepática, la evaluación de los parámetros bioquímicos en el suero se realizó al concluir los períodos de administración terapéutica del GHRP6 y el placebo. Luego de aplicar el esquema de 15 días de tratamiento con el péptido, se detectaron valores significativamente inferiores de ALAT ($p < 0,01$) y ASAT ($p < 0,05$) en los animales tratados con el GHRP6, en comparación con el grupo que recibió el placebo (Tabla 12). En cuanto a los parámetros bioquímicos indicadores de la función de síntesis del hígado, la aplicación de un tratamiento por 15 días con el GHRP6, aún en ausencia de CCL₄, no facilitó que se incrementaran los valores de colesterol, triglicéridos, albúmina y proteínas totales en el suero (Tabla 12). Tanto en el grupo GHRP6-15d como en el grupo Placebo-15d, la concentración en el suero de los parámetros mencionados anteriormente permanecieron estadísticamente inferiores a los del grupo Controles Sanos (al menos $p < 0,05$).

Tabla 12. Evaluaciones bioquímicas de la fase de reversión de la Cirrosis.
Tratamiento por 15 días en ausencia del CCL₄.

Parámetros	Controles Sanos (n=7)	Placebo-15d (n=10)	GHRP6-15d (n=10)
ALAT (U/L)	62,8 ± 6,4 (a)	264,4 ± 41,2 (b)	150,6 ± 15,3 (c)
ASAT (U/L)	170,9 ± 19,9 (a)	396,4 ± 62,9 (b)	263,8 ± 27,3 (c)
Colesterol (mmol/L)	2,2 ± 0,1 (a)	1,6 ± 0,2 (b)	1,9 ± 0,1 (b)
Triglicéridos (mmol/L)	1,5 ± 0,2 (a)	0,79 ± 0,09 (b)	0,73 ± 0,09 (b)
Albumina (g/L)	47,5 ± 1,0 (a)	35,1 ± 1,2 (b)	34,9 ± 1,0 (b)
Proteínas Totales (g/L)	60,6 ± 1,0 (a)	45,8 ± 1,3 (b)	46,3 ± 1,6 (b)

Las determinaciones se realizaron en muestras de suero obtenidas al finalizar los cinco meses de administración de CCL₄ y los 15 días posteriores de administración de los tratamientos. Los datos se reportan en la tabla como el valor promedio ± el EEM por grupo experimental. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En el esquema de tratamiento terapéutico por 60 días, en presencia del CCL₄, no se observaron diferencias significativas entre los grupos GHRP6-60d y Placebo-60d en los niveles séricos de transaminasas, ni en ninguno de los indicadores de la función de síntesis del hígado estudiados ($p > 0,05$ en todos los casos) (Tabla 13). En todos los parámetros evaluados, los valores de ambos grupos resultaron significativamente diferentes del grupo Controles Sanos (al menos $p < 0,05$).

Tabla 13. Evaluaciones bioquímicas de la fase de reversión de la Cirrosis.
Tratamiento por 60 días en presencia del CCL₄.

Parámetros	Controles Sanos (n=7)	Placebo-60d (n=12)	GHRP6-60d (n=12)
ALAT (U/L)	66,3 ± 5,5 (a)	180,6 ± 16,2 (b)	194,8 ± 17,5 (b)
ASAT (U/L)	184,0 ± 32,6 (a)	306,8 ± 20,9 (b)	315,5 ± 22,7 (b)
Colesterol (mmol/L)	2,1 ± 0,03 (a)	1,5 ± 0,2 (b)	1,6 ± 0,1 (b)
Triglicéridos (mmol/L)	2,0 ± 0,1 (a)	0,83 ± 0,2 (b)	0,85 ± 0,2 (b)
VLDL (mmol/L)	0,90 ± 0,04 (a)	0,31 ± 0,04 (b)	0,33 ± 0,05 (b)
Albumina (g/L)	41,1 ± 1,1 (a)	26,4 ± 1,1 (b)	27,3 ± 1,1 (b)
Proteínas Totales (g/L)	62,6 ± 1,6 (a)	47,3 ± 1,1 (b)	47,3 ± 1,3 (b)

Las determinaciones se realizaron en muestras de suero obtenidas al finalizar los 60 días de administración de los tratamientos, en el séptimo mes del estudio. Los datos se reportan en la tabla como el valor promedio ± el EEM por grupo experimental. Para las comparaciones estadísticas múltiples se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

IV.4.4 Efectos del GHRP6 sobre el estrés oxidativo hepático.

En la Tabla 14 se observan los notables incrementos en los marcadores del estrés oxidativo (MDA, HPT, PPL y PAOP) que se detectaron en todos los grupos experimentales intoxicados con el CCL₄, en comparación con el grupo Controles Sanos (en todos los casos p<0,001). Por ejemplo, los niveles de MDA de los grupos CCL₄+Placebo y Placebo-60d se incrementaron 20 y 30 veces, respectivamente, en comparación con los animales sanos (ambos p<0,0001). La administración del GHRP6, en los diferentes esquemas de tratamiento, atenuó de forma significativa todos los marcadores del daño oxidativo mencionados anteriormente, en comparación con los respectivos grupos placebo (al menos p<0,01). Con respecto a Catalasa y SOD, la administración del agente hepatotóxico provocó incrementos significativos en las actividades específicas de estas enzimas antioxidantes en los animales que recibieron el placebo, en comparación con los animales sanos (al menos p<0,01) (Tabla 14). No obstante, en los grupos tratados con el GHRP6, tanto de forma concomitante como terapéutica, la actividad específica de ambas enzimas fue significativamente superior a los respectivos grupos placebo (al menos p<0,05).

Tabla 14. Evaluación de los parámetros indicadores del estrés oxidativo en la cirrosis.

Grupos	HPT	PAOP	MDA	PPL	CAT	SOD
Controles Sanos	12,1 ± 1,0	3,9 ± 0,5	0,22 ± 0,01	0,71 ± 0,04	73,5 ± 8,7	17027 ± 667
CCL ₄ +Placebo	88,6 ± 6,8	24,2 ± 1,5	4,5 ± 0,4	3,7 ± 0,2	203,6 ± 16,7	21500 ± 1033
CCL ₄ +GHRP6	24,1 ± 2,7 ***	14,9 ± 0,7 ***	2,5 ± 0,2 ***	2,2 ± 0,2 ***	638,7 ± 38,8 ***	52492 ± 3080 ***
Placebo-15d	86,6 ± 3,8	26,8 ± 2,0	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	304,0 ± 22,9	24361 ± 858
GHRP6-15d	37,2 ± 2,6 ***	14,7 ± 0,4 ***	1,7 ± 0,1 ***	2,2 ± 0,1 ***	499,0 ± 38,8 ***	32143 ± 909 ***
Placebo-60d	153,5 ± 10,4	31,8 ± 1,2	6,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2	370,0 ± 35,3	33818 ± 1501
GHRP6-60d	81,2 ± 3,5 ***	17,7 ± 1,4 ***	3,0 ± 0,3 ***	1,9 ± 0,2 **	505,5 ± 35,8 *	50606 ± 1648 ***

Las determinaciones se realizaron en homogenados de hígado de las ratas. Los datos se presentan como el promedio ± el EEM por grupo experimental. Grupo Controles Sanos, n=7. Grupos Placebo-15d y GHRP6-15d, n=10. En el resto de los grupos, n=12. HPT: Hidroperóxidos totales; PAOP: Productos avanzados de la Oxidación de Proteínas; MDA: Malondialdehído; PPL: Potencial de Peroxidación lipídico; SOD: Superóxido Dismutasa total. Los parámetros HPT, PAOP, MDA y PPL están reportados en nmoles/mg de proteínas totales. Las enzimas Catalasa y SOD se reportan en U/min por gramo de tejido. Los asteriscos reflejan la significación estadística de las comparaciones realizadas con la prueba t para datos no pareados, entre los grupos tratados con el GHRP6 y los respectivos grupos placebo; (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

IV.4.5 Resultados inmunohistoquímicos en la Cirrosis Hepática.

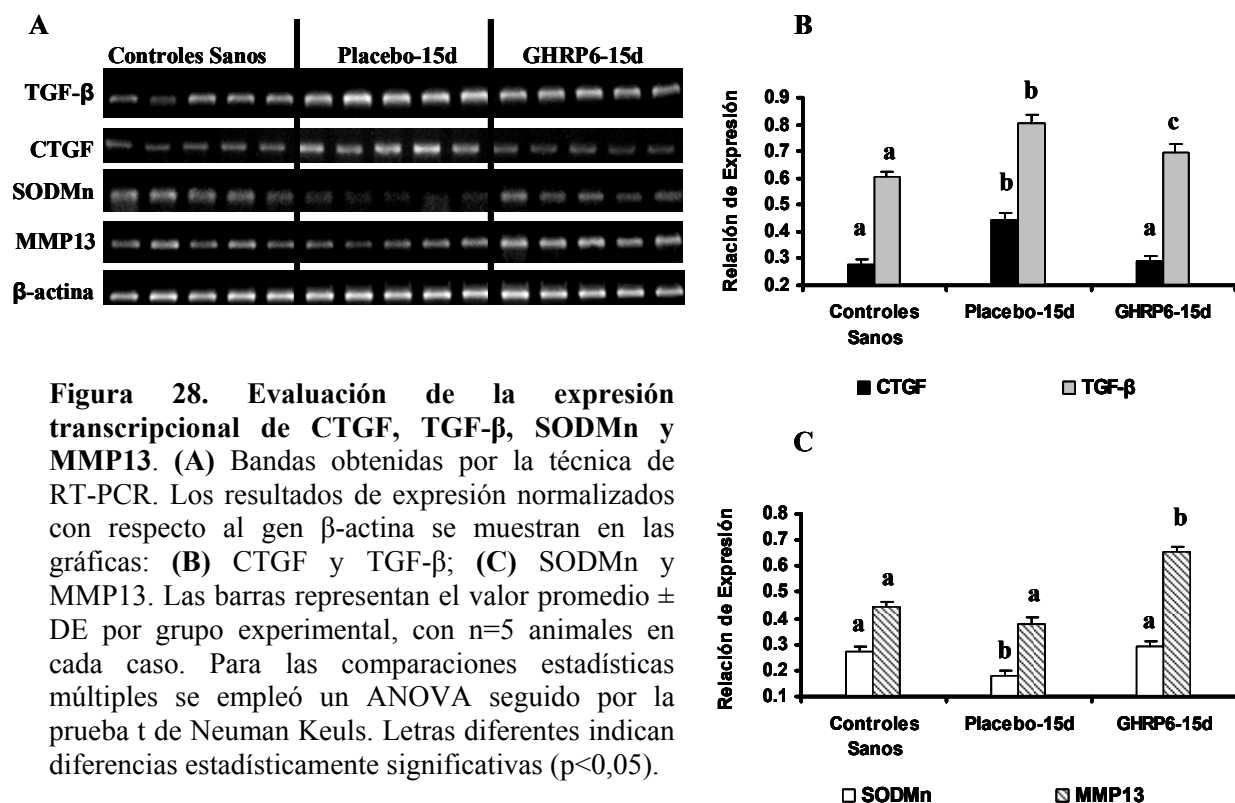
La proteína α SMA es un marcador molecular de las células estrelladas hepáticas (CEH) transdiferenciadas a miofibroblastos (Carpino y cols., 2005). Como se observa en las Figuras 26A-26D, el anticuerpo monoclonal anti- α SMA reaccionó solamente en las células de los bordes de los cordones fibróticos. En todos los grupos que recibieron el GHRP6, tanto de forma preventiva (dato no mostrado) como en ambos esquemas terapéuticos (Figura 26A y 26B), se detectó menor cantidad de marca positiva para α SMA que en los respectivos grupos placebo (Figuras 26C y 26D). Incluso al comparar cordones de similar grosor, se detectó menor intensidad y cantidad de marca positiva a α SMA en los animales tratados con el péptido que en los que recibieron el placebo (Figuras 26B y 26D). El reconocimiento contra TGF- β fue también en los cordones fibróticos (Figuras 26E-26H). Al igual que con el α SMA, en los animales tratados con el GHRP6 (Figuras 26E y 26F) se observó menor cantidad de marca positiva para TGF- β que en los grupos de placebo (Figuras 26G y 26H), independientemente del esquema de administración empleado. Esto se hizo también evidente al comparar la expresión de TGF- β en cordones de igual grosor (Figuras 26F y 26H).

La Vimentina es una proteína filamentosa que permite identificar tanto a las células de Kupffer como a las CEH, ambas en sus formas activadas, que se localizan en los cordones y en el parénquima hepático (Wu y cols., 1996; Geerts y cols., 2001). Como se puede apreciar en las Figuras 27A y 27B, los animales tratados con el GHRP6, tanto de la fase de prevención como de reversión (dato no mostrado) de la cirrosis, exhibieron menor cantidad de células positivas a Vimentina que los animales que recibieron el placebo. El reconocimiento inmunohistoquímico del anticuerpo monoclonal contra p53 fue fundamentalmente en estas mismas formas celulares, las células de Kupffer y las CEH, además del infiltrado mononuclear. Esto puede apreciarse en las Figuras 27C y 27D, donde además se observa que el marcaje de p53 resultó superior en intensidad y cantidad en los animales tratados con el GHRP6 que en los grupos placebo, en ambas fases del estudio. Otro marcaje de gran interés fue el realizado utilizando un anticuerpo monoclonal contra Fas-L. Como se muestra en las Figuras 27E y 27F, el reconocimiento de Fas-L, que ocurrió específicamente en las células de Kupffer, resultó ser en mayor cantidad en los animales que recibieron el placebo que en los tratados con el GHRP6, en todos los esquemas de administración. Por último, en las Figuras 27G y 27H se muestra que en los animales tratados con el GHRP6, independientemente del esquema empleado, se detectó mayor cantidad de núcleos de hepatocitos marcados positivamente a ciclina D1 que en los respectivos grupos placebo.

IV.4.6 Influencia del GHRP6 en la expresión transcripcional de los genes TGF- β , CTGF, SODMn y MMP13 en la Cirrosis Hepática.

En el grupo Placebo-15d se incrementaron de forma significativa los niveles de expresión transcripcional de ambas citocinas profibrogénicas, TGF- β y CTGF, en comparación con las ratas sanas (en ambos casos $p < 0,001$) (Figura 28A y 28B). En cambio, en el grupo GHRP6-15d se detectó una reducción significativa de la expresión transcripcional de ambos factores de crecimiento, en comparación con el grupo placebo (al menos $p < 0,05$).

La administración de CCL₄ provocó también la reducción significativa de la expresión transcripcional de la enzima SODMn en el grupo Placebo-15d ($p < 0,05$); mientras que en los animales tratados con el GHRP6, el nivel de expresión de esta enzima fue similar al de los animales intactos (Figuras 28A y 28C). Por último, se evaluó la expresión transcripcional de la enzima MMP13, la cual ha sido específicamente involucrada en la reversión de la fibrosis en las ratas (Fallowfield y cols., 2007). Como se muestra en las Figuras 28A y 28C, los animales del grupo Placebo-15d mostraron igual nivel de expresión de MMP13 que los animales sanos ($p > 0,05$). En contraste, en el grupo GHRP6-15d se detectó un incremento significativo en la expresión de esta metaloproteasa de matriz extracelular, en comparación con el grupo Placebo-15d ($p < 0,01$).



IV.4.7 Estudio del hígado por Microscopía Electrónica de Transmisión.

En la Figura 29A se observa, de forma representativa, la ultra-estructura de una célula hepática de un animal sano. La evaluación por MET detectó la presencia de gran cantidad de fibras colágenas y lípidos en los hígados de los animales que recibieron el CCL₄. Otras formas de daño inducido por el hepatotóxico fueron las afectaciones de las mitocondrias (vacuolización y pérdida de sus crestas), así como la dilatación del retículo endoplasmático (Figura 29B). En cambio, en los animales que recibieron el tratamiento terapéutico con el GHRP6 por 15 días en ausencia del CCL₄, para revertir la cirrosis, se observó la protección ejercida por el péptido sobre la estructura de las mitocondrias (Figuras 29C y 29D). Otros hallazgos detectados en las microfotografías del grupo GHRP6-15d incluyen la presencia de retículo endoplasmático dentro de los límites normales y de gránulos de glucógeno en el citoplasma; los que son indicativos de una marcada actividad de síntesis en los hepatocitos de los animales tratados con el péptido (Figura 29D).

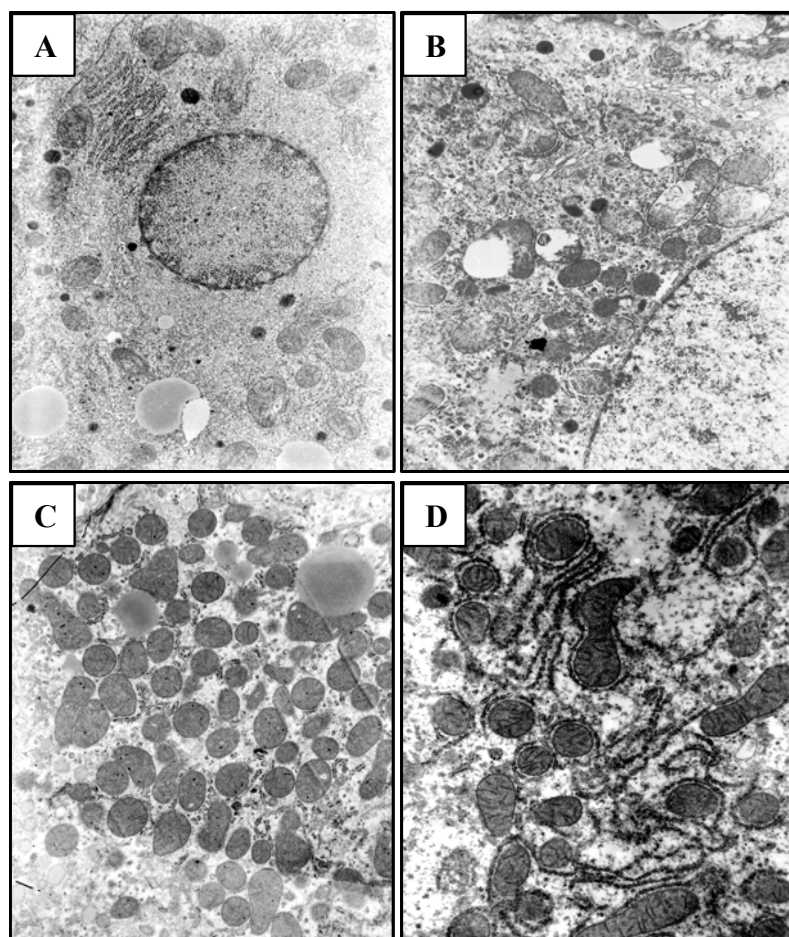


Figura 29. Estudio por MET de los hígados cirróticos.

(A) Imagen representativa de la ultra-estructura de los hepatocitos de los animales del grupo Controles Sanos.

(B) Imagen representativa de la ultra-estructura de los hepatocitos de los animales del grupo Placebo-15d. Nótese las afectaciones en las mitocondrias.

(C) Imagen representativa de los hepatocitos de los animales del grupo GHRP6-15d. Nótese el mayor número de mitocondrias de aspecto viable.

(D) Imagen representativa de los hepatocitos de los animales del grupo GHRP6-15d, en mayor aumento que la imagen C. Nótese la preservación de las crestas mitocondriales. Se observa también gran cantidad de retículo endoplasmático y gránulos de glucógeno en el citoplasma.

V. DISCUSIÓN

El modelo de IMA establecido en este trabajo de tesis implicó un daño agudo al miocardio, inducido por un episodio de I/R en animales sanos. Este modelo remeda la situación clínica de oclusión abrupta de la arteria coronaria, producida mayoritariamente por un trombo, en individuos aparentemente sanos. Para este estudio se empleó la especie porcina, dadas las semejanzas que tiene con la especie humana en cuanto a la estructura del árbol coronario (White y cols., 1986). Además, el cerdo brinda facilidades de manipulación para el procedimiento quirúrgico y la posterior evaluación anátomo-patológica de las dimensiones del IMA; por lo cual ha sido ampliamente utilizado en la búsqueda de agentes cardioprotectores (Andreka y cols., 2007; Zhao y cols., 2007). Los resultados de la fase de estandarización del biomodelo demostraron que los tiempos de I/R ensayados permitían establecer el evento necrótico en toda su extensión, tanto para los IMA pequeños como grandes; lo cual favoreció su diagnóstico macroscópico de manera inequívoca. La similitud de los resultados obtenidos entre el grupo de animales empleados en la fase de estandarización del biomodelo y, posteriormente, los cerdos que recibieron el placebo, demostraron la repetibilidad y reproducibilidad del modelo animal (Tablas 5 y 6). Los resultados de sobrevida (50%), así como el tamaño de las lesiones obtenidas a las 72 horas de reperfusión, permitieron evaluar el efecto farmacológico ejercido por el GHRP6 en la reducción de la talla del infarto. Por otro lado, la similitud entre todos los grupos experimentales en cuanto al área en riesgo durante la isquemia (Tabla 5), determinada mediante la administración del reactivo Azul de Evans (Neuhof y cols., 2004); indica que los resultados obtenidos no fueron influenciados por la existencia de circulación colateral. El sufrimiento hipóxico del corazón se estableció por igual en todos los animales del estudio; lo cual se demostró por la similitud entre los grupos experimentales con respecto a la elevación del segmento ST (Tabla 6). Este parámetro del ECG es un reconocido indicador de la isquemia aguda del miocardio (Ammar y cols., 2004).

La talla final del IMA fue el principal parámetro evaluado en este estudio, el cual se relaciona con la sobrevida de los pacientes que sufren un episodio de oclusión aguda de la arteria coronaria (Brodie y cols., 2007; Piot y cols., 2008). Los resultados obtenidos en la evaluación de las dimensiones de los infartos demostraron que la aplicación del GHRP6 redujo eficazmente el área de necrosis (en más del 75%) (Tabla 5). La muralidad del IMA, parámetro que también está relacionado con la evolución ulterior y pronóstico del proceso (Orn y cols., 2007), también disminuyó significativamente por el tratamiento con el péptido (en más del 50%). Una de las características del

ECG en el IMA es la presencia de las ondas Q patológicas, las que indican la instauración de un foco de necrosis en el miocardio, luego del episodio de isquemia. Este es un procedimiento de alto valor y de universal aceptación para el diagnóstico clínico del IMA, pues informa sobre su extensión en correspondencia con el número de derivaciones comprometidas (Bayes, 2007). El estudio de ECG realizado a los cerdos confirmó los beneficios de la aplicación del GHRP6 en la reducción de la talla del infarto, ya que, en los animales que recibieron el tratamiento con el péptido, se observó una marcada disminución del número de derivaciones del ECG que mostraron ondas Q patológicas (Figura 3). Mediante la tinción con NBT y el estudio histológico se confirmó que la necrosis fue la forma prominente de daño al miocardio. La apariencia blanquecina de las lesiones indicaba claramente la conocida necrosis de Zenker, de aspecto atigrado, reportada también por otros autores (Hao y cols., 2002; Pinelli y cols., 2004). Además de la reducción del área de necrosis, la administración del GHRP6 disminuyó significativamente la afectación de las fibras cardiacas en las zonas adyacentes al núcleo del infarto (Figura 4); lo cual se demostró mediante la cuantificación de los núcleos dañados irreversiblemente y de las penínsulas necróticas (Tabla 7). La elevación de la enzima CK-MB en suero, así como de la CRP, constituyen importantes recursos diagnósticos en la clínica del IMA (Orozovic y cols., 2007). La evaluación cinética realizada demostró que ambos parámetros disminuyeron en los animales tratados con el péptido, lo que indica también la atenuación del daño al músculo cardíaco (Figura 5).

Como puede notarse, se obtuvo una marcada convergencia en los hallazgos morfológicos, electrofisiológicos, histológicos y bioquímicos; todos los cuales enfatizan las potencialidades del hexapéptido GHRP6 en el rescate de células miocárdicas durante el episodio de I/R. Como se mencionó en el acápite II.1.4, existen antecedentes en la literatura sobre el efecto cardioprotector del GHRP6. En estos estudios se emplean, mayoritariamente, modelos de daño por I/R en órganos aislados, con cortos períodos de reperfusión; en los cuales no se establecieron áreas de necrosis y por tanto, no se evaluó la talla final del infarto (De, V y cols., 1997; Berti y cols., 1998; Locatelli y cols., 1999; Weekers y cols., 2000). En la evaluación *in vivo* de la hexarelina en un modelo de IMA en ratas, inducido quirúrgicamente por la oclusión no reversible de la arteria coronaria, tampoco se estudió el efecto de este análogo en la talla del IMA, sino en la disfunción contráctil post-infarto (Tivesten y cols., 2000). El antecedente más relevante es la evaluación del GHRP6 en perros con una taquimiocardiopatía dilatada previa, inducida por un marcapasos, los cuales son sometidos además a la inducción de un IMA por oclusión aguda de la arteria coronaria (Shen y cols., 2003b).

En este caso, los animales con MCD se trataron con el péptido GHRP6 a una dosis de 200 µg/Kg, durante las tres semanas previas a la inducción del IMA. Los autores de este estudio realizado en perros no detectaron diferencias entre los grupos de tratamiento, en cuanto al peso y las dimensiones del infarto, evaluados en base a los mismos parámetros que en el presente ensayo en cerdos. La dosis que se empleó del GHRP6 en los cerdos se debió precisamente a que 400 µg/Kg era el doble de la dosis empleada por Shen y colaboradores, y para la cual no se obtuvieron diferencias significativas en la talla del IMA. Más recientemente se evaluó la ghrelina, a una dosis de 150 µg/Kg, en un modelo de IMA en ratas inducido por oclusión arterial irreversible (Schwenke y cols., 2008). Los autores de este trabajo tampoco encontraron diferencias significativas en la talla del infarto entre los animales tratados con la hormona, administrada inmediatamente posterior a la oclusión de la arteria, y los animales que recibieron el placebo. Por tal motivo, el presente estudio realizado en cerdos, ofrece las primeras evidencias sobre el efecto farmacológico del péptido GHRP6 en la reducción de la talla del infarto; empleando un modelo *ad integrum* de oclusión coronaria aguda y posterior reperfusión. La diferencia de los resultados obtenidos en los cerdos, en cuanto a la reducción de la talla del IMA, en comparación con los otros estudios publicados, puede atribuirse tanto al empleo de una mayor dosis del péptido, como al diseño de administración utilizado; en el cual se aplicó el tratamiento varias veces durante la isquemia y las primeras 72 horas de la reperfusión. Se requieren estudios adicionales que evalúen esta posibilidad, y establezcan la forma óptima de administración del péptido para obtener el mejor resultado en términos de la reducción de la talla del infarto.

El esquema de múltiples administraciones del GHRP6 que se utilizó en los cerdos infartados, durante la fase de isquemia, fue concebido intencionalmente de este modo para evaluar el impacto del tratamiento en los trastornos de conducción y ritmo del ventrículo izquierdo. Los resultados obtenidos indicaron que la administración del GHRP6 ni atenúa ni exacerba la ocurrencia y duración de las arritmias de la fase de isquemia o de los primeros minutos de la reperfusión (Tabla 6). Estos resultados son confirmados por los otros autores, tanto en el modelo de IMA en perros (Shen y cols., 2003b), como en las ratas (Schwenke y cols., 2008); en los cuales ni la administración del GHRP6 o la GH, ni de la ghrelina, respectivamente, modificó la frecuencia y duración de los latidos arrítmicos ventriculares. La mortalidad detectada por estos autores no se relacionó directamente con las arritmias, sino con situaciones de bajo gasto, las cuales se atenuaron por el tratamiento con el GHRP6 en los perros, y con la ghrelina en las ratas; favoreciendo así la sobrevida

de los animales. En cambio, en el presente ensayo en cerdos infartados, la mortalidad acontecida durante la fase de isquemia se debió exclusivamente a la fibrilación ventricular. Conforme a que el tratamiento con el GHRP6 no atenuó la ocurrencia de las alteraciones eléctricas asociadas a la isquemia, no favoreció tampoco la sobrevida de los animales.

A diferencia del infarto, donde el daño se produce de forma aguda, la MCD es una forma de disfunción sistólica y/o diastólica del miocardio, que generalmente se asocia a una cronicidad en la inducción del daño al músculo. La MCD inducida por citostático, por ejemplo, se relaciona con un rango específico de dosis acumulada del fármaco, y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad puede ocurrir meses o incluso años posteriores al tratamiento; período durante el cual se deteriora paulatinamente la estructura y función del músculo cardiaco (Petit, 2004).

La administración de la DX es una forma muy utilizada para desarrollar un modelo de MCD en ratas (Hayward y Hydock, 2007). En el presente estudio, la dosis acumulada de la DX en los animales fue similar a la alcanzada por otros autores (Mukherjee y cols., 2003). La técnica de ecocardiografía es la más utilizada en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con MCD (Chuang y cols., 2000). En este ensayo, las evaluaciones ecocardiográficas seriadas que se realizaron a las ratas permitieron evaluar en el tiempo la afectación cardiaca inducida por la DX. De esta forma, se pudo establecer un modelo de MCD con una caída de la función cardiaca de un 30% aproximadamente (Figuras 8 y 9). Este grado de disfunción del miocardio es relevante clínicamente (Jensen y cols., 2002), lo cual se evidenció además por la alta mortalidad del modelo (Figura 14). El cálculo del porcentaje de fracción de eyección del ventrículo izquierdo mediante ecocardiografía, es de gran utilidad para el diagnóstico de la MCD y se correlaciona aceptablemente con otras técnicas de estudio del músculo cardiaco (Chuang y cols., 2000). Además de este parámetro funcional, se evaluaron también en las ratas los parámetros relacionados con la remodelación del ventrículo izquierdo; es decir, los diámetros de la cavidad así como el grosor del septum y la pared posterior, tanto en la diástole como en la sístole. Los resultados de la evaluación ecocardiográfica de los animales, tanto en la fase de prevención como de reversión de la MCD, demostraron que la administración del GHRP6 previno y revirtió, en cada fase del ensayo, la dilatación del miocardio inducida por el citostático, tanto desde el punto de vista estructural, como funcional (Figuras 8 y 9). Varios antecedentes de la literatura internacional describen también la existencia de un efecto cardioprotector inducido por la administración repetida de los GHRP. Entre estos se destaca la evaluación del GHRP2 en un modelo de atontamiento del miocardio *ex vivo*, en el cual el

tratamiento con el péptido previno la disfunción diastólica producida por la isquemia (Weekers y cols., 2000). Igualmente, dos estudios reportaron los efectos beneficiosos de la hexarelina en la prevención y reversión de la disfunción sistólica y diastólica producida por la I/R; en una preparación de corazón aislado de rata (Locatelli y cols., 1999), y en un modelo de IMA en ratas (Tivesten y cols., 2000). Estas acciones cardiotónicas inducidas por los GHRP, favorecen tanto la contractilidad como la relajación del músculo cardiaco, sin producir incremento significativo en la frecuencia (Xu y cols., 2003). Como se explicó en el acápite II.1.2, los GHRP ejercen su acción liberadora de la GH en la pituitaria mediante la elevación de la concentración intracelular del Ca^{2+} de forma bifásica: una primera fase transiente y una segunda fase persistente (Herrington y Hille, 1994). Se ha demostrado que los GHRP poseen un efecto inotrope positivo en el miocardio dado por su capacidad de movilización del Ca^{2+} intracelular, la cual ocurre también en estas dos fases (Xu y cols., 2003) En ambos sistemas biológicos, los GHRP inducen primeramente una liberación inmediata de Ca^{2+} , a partir de los sitios de almacenamiento intracelular (fase transiente); y posteriormente aumentan el influjo de Ca^{2+} a la célula a través de canales dependientes de voltaje tipo L (fase persistente). Además, se ha reportado, tanto en la pituitaria como en el miocardio, que la fase de influjo de Ca^{2+} , pero no la de liberación, está mediada por la ruta de señalización de la PKC/PLC y el IP3 como segundo mensajero (Wu y cols., 1997; Xu y cols., 2003); la cual está asociada a la activación del GHS-RIa. Se ha observado que incluso una única administración de hexarelina, en voluntarios sanos, incrementa la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (Bisi y cols., 1999). Este parece ser primariamente un efecto sistólico inducido por el aumento del Ca^{2+} intracelular en las fibras miocárdicas, lo que promueve el incremento en la fuerza de contracción. Estas acciones tipo inotrope positivas son sin duda relevantes en los presentes resultados obtenidos con el GHRP6 en la prevención y reversión de la MCD inducida por la DX. Sin embargo, debido a la corta duración del efecto inotrope, 60 minutos cuando máximo, es evidente que están involucrados otros mecanismos moleculares en las acciones cardioprotectoras y cardiotróficas de estos péptidos.

El único antecedente de evaluación preclínica del péptido GHRP6 en un modelo de MCD, es el estudio realizado en los hámsteres TO2 (Iwase y cols., 2004). Estos animales nacen con una deficiencia en la proteína δ -sarcoglicano del miocardio, y desarrollan espontáneamente con la edad una MCD. Los hámsteres TO2 remedan los casos de MCD en humanos que aparecen como consecuencia de la deficiencia en esta proteína; la cual es una enfermedad esporádica, de baja

incidencia en relación al total de pacientes afectados (Osterziel y cols., 2001). En ese estudio en hámsteres, los autores evaluaron los efectos del GHRP6 administrado durante cuatro semanas, a una dosis de 100 µg/Kg por día, en la prevención de la MCD. En ese caso, no se estudió el efecto del péptido en la reversión de la enfermedad. Los autores de ese trabajo demostraron mediante ecocardiografía, al igual que en el presente estudio en ratas, que el GHRP6 atenuó la dilatación del diámetro diastólico y la caída de la fracción de eyección en los animales. Este efecto fue asociado por Iwase y colaboradores con la reducción del daño estructural observado histológicamente en los corazones tratados con el péptido, en comparación con los animales que recibieron el placebo y altas dosis de la GH (Iwase y cols., 2004).

En el presente ensayo en ratas inyectadas con la DX, también se tuvo en cuenta la relación entre la estructura y la funcionalidad del músculo cardíaco. Los estudios histológicos del miocardio que se realizaron con los animales de la fase de prevención de la MCD, demostraron que la aplicación concomitante del GHRP6 durante el período de administración de la DX, previno de forma exitosa el daño en las fibras cardíacas (Figura 10). La evaluación histológica cuantitativa confirmó lo anterior, en tanto que la principal afectación de las fibras cardíacas en los animales tratados con el GHRP6 fue la tumefacción; mientras que en los animales que recibieron el placebo, las ondulaciones y fracturas de las fibras fueron muy frecuentes (Figura 11). Tal preservación de la maquinaria contráctil se correspondió con la no alteración de la función cardíaca en los animales tratados concomitantemente con el GHRP6 (Figura 8). Por el contrario, en los animales que por ecocardiografía se les diagnosticó la MCD, y que posteriormente recibieron el tratamiento terapéutico con el GHRP6 por 15 días, se observó una reversión efectiva de la disfunción contráctil que no se puede relacionar con una mejoría estructural de las fibras cardíacas, al menos al microscopio de luz visible (Figuras 9, 10 y 11). La caracterización ultraestructural del miocardio indicó, por primera vez, el efecto del GHRP6 en la preservación de las mitocondrias en el músculo cardíaco de animales que revirtieron la enfermedad (Figura 17). Esta mejoría ultraestructural puede asociarse con la recuperación inducida por el GHRP6 de la función cardíaca, ya que implica una mayor disponibilidad de energía para aumentar la fuerza contráctil, con lo cual se logra disminuir el remodelado ventricular, sin aumentar el gasto cardíaco.

La MCD es una de las principales causas del síndrome de Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC) (Maisch y cols., 2002). La administración de la DX a altas dosis se ha utilizado también para desarrollar modelos de ICC (Gnanapragasam y cols., 2007; Wang y cols., 2007). En el presente

estudio, la disfunción sistólica generada por la DX en las ratas provocó la aparición de cambios anátomo-patológicos potencialmente relacionados con la instauración de este síndrome; el cual se caracteriza por la hipertensión pulmonar y la congestión pasiva en el hígado. Este experimento carece de las evaluaciones hemodinámicas requeridas para poder confirmar y evaluar el posible fallo cardiaco. No obstante, el incremento detectado en los índices de pesos relativos de los órganos (Tabla 8), así como las evidencias histológicas de congestión septal y pasiva en el pulmón, y la marcada congestión pasiva observada en el hígado (Figura 12); indican la potencial instauración de este síndrome en las ratas que recibieron el placebo. En este sentido, los resultados obtenidos demuestran que en los animales tratados con el GHRP6 se previno la instauración de la ICC por cuanto se atenuó el incremento en los índices de peso de los órganos, así como por la ausencia de congestión en órganos extra-cardiacos. Estudios más recientes corroboran estas observaciones, al demostrar la efectividad de estos péptidos secretagogos en un modelo de ICC *per se* (Xu y cols., 2005). Los resultados obtenidos con la administración del GHRP6 en la prevención y reversión de la MCD y la potencial ICC asociada a la misma, se reflejaron sistémicamente en el incremento significativo en la sobrevivencia de los animales, en ambas fases del estudio (Figura 14).

Además de prevenir la cardiotoxicidad inducida por la DX, el tratamiento concomitante con el GHRP6 previno también otras formas de daño en tejidos extra-cardiacos. Entre estos se encuentran los efectos de protección inducidos por el péptido en el epitelio de los túbulos renales y en la mucosa bronquial, los cuales no se habían reportado con anterioridad (Figura 13). Asimismo se demostró, tanto por análisis histológicos como por la evaluación de los niveles de ALAT en el suero, la hepatoprotección ejercida por el GHRP6, que permitió atenuar la necrosis hepatocitaria y disminuir el depósito de material fibrótico periportal inducido por la DX (Figura 13). Estos resultados indican que el hígado es también un órgano diana de las acciones citoprotectoras de esta molécula.

El efecto del GHRP6 de prevenir la necrosis hepatocitaria se evaluó también en el modelo de daño agudo inducido por la I/R del hígado. De la magnitud del daño ocasionado por la hipoxia depende, en muchos casos, la funcionalidad del tejido hepático y la sobrevivencia de los pacientes (Barber y cols., 2007). Los tiempos de I/R del hígado que se emplearon en este experimento están avalados por reportes en la literatura internacional (Ajamieh y cols., 2002). El indicador clínico por excelencia del daño hepático es la determinación de los niveles circulantes de las transaminasas ALAT y ASAT, marcadores de citólisis de los hepatocitos. Los resultados de la determinación de ambas

enzimas en el suero de los animales (Figura 21), así como las evaluaciones histológicas realizadas (Figuras 18 y 19), demostraron que el modelo de I/R ensayado provocó un daño severo en el parénquima hepático de los animales que recibieron el placebo; que incluyó la necrosis como principal forma de muerte, además de extensas zonas hemorrágicas. De forma coincidente, tanto la histología como la marcada disminución en los valores séricos de ALAT y ASAT, indicaron que el tratamiento profiláctico con el GHRP6 favoreció la preservación de la viabilidad de los hepatocitos, así como la prevención de la hemorragia parenquimal, ante un episodio de I/R (Figuras 18, 19 y 21). Estos resultados, sin antecedentes en la literatura, corroboran los obtenidos en el modelo de toxicidad por la DX, en cuanto al marcado efecto hepatoprotector que ejerce el péptido GHRP6.

El uso de modelos de daño por I/R no solo posee relevancia para la disrupción vascular aguda (trombosis y embolismo) y la cirugía hepática mayor, incluyendo los trasplantes; sino también para la fisiopatología del síndrome de DMO (Yang y cols., 2004b). Se conoce que una vez restaurado el flujo sanguíneo, el hígado es capaz de inducir un SRIS que puede desencadenar el DMO (Kimura y cols., 2006; Jiang y cols., 2007). Esto se debe a la activación, mediada principalmente por las ERO, de las células de Kupffer y los neutrófilos; las que producen el incremento masivo e incontrolado de factores circulantes pro-inflamatorios como el TNF α y la IL6. Estas citocinas facilitan a su vez el aumento en la expresión de moléculas de adhesión y el secuestro de células polimorfonucleares en órganos remotos (Meyer y cols., 1998). Los análisis realizados en el modelo de I/R del hígado confirmaron el marcado influjo de infiltrado inflamatorio en el tejido hepático, y en órganos remotos como los pulmones, los riñones y los intestinos; demostrado tanto por hallazgos histológicos como por la determinación de la enzima MPO hepática e intestinal (Figura 22). Esto ha sido descrito también por otros autores que emplearon el mismo diseño experimental en ratas, para inducir el modelo de DMO (Liu y cols., 1996). El estudio histológico empleando escalas de semicuantificación es la principal herramienta, ampliamente validada en la literatura internacional, para evaluar el grado de afectación en un escenario de DMO (Jiang y cols., 2007; Zhang y cols., 2008). La cuantificación de las áreas dañadas del intestino, mayoritariamente hemorrágicas, así como los análisis histológicos realizados, demostraron que el GHRP6 disminuyó significativamente la extensión y magnitud del daño en el intestino delgado. La reperfusión del hígado produce un cuadro similar al distrés severo del adulto en los pulmones (Colletti y Green, 2001); el cual se atenuó también con la intervención profiláctica del GHRP6. Igualmente, la presencia mayoritaria de cambios reversibles en el epitelio de los túbulos renales, unido a la no modificación significativa de

los niveles de creatinina en el suero de los animales, demostraron la marcada prevención del daño renal inducida por el GHRP6 (Figuras 19 y 20). Estos resultados corroboran los obtenidos en el modelo de daño químico inducido por la administración de la DX, en cuanto a las acciones citoprotectoras multiorgánicas que ejerce el GHRP6.

No existen antecedentes en la literatura internacional que relacionen a estos péptidos secretagogos de la GH con una acción antifibrótica. Hasta el momento, tanto los GHRP como la ghrelina se habían considerado, principalmente, como estrategias terapéuticas para mejorar el estado catabólico asociado a la afectación del eje GH/IGF-1 en los pacientes cirróticos (Wallace y cols., 2002; Tacke y cols., 2003). Recientemente se demostró, *in vitro*, que la hexarelina es capaz de inhibir la proliferación, la síntesis de colágeno y la expresión de TGF- β , inducida por la Angiotensina II, en fibroblastos cardiacos (Xu y cols., 2007). Sin embargo, la evaluación de los GHRP en un modelo de fibrosis *ad integrum* no se ha reportado con anterioridad.

El esquema de administración de CCL₄ empleado en este trabajo de tesis provocó la enfermedad fibrótica del hígado en los animales; lo cual se demostró principalmente por las evidencias histológicas (Figura 24). Ésta fue además clínicamente relevante, teniendo en cuenta las alteraciones de la homeostasia sistémica que se manifestaron en los animales, principalmente la aparición de la ascitis (Anexo 17). Con el objetivo de realizar una evaluación completa de la potencialidad terapéutica del GHRP6 como agente antifibrótico, se realizaron tres esquemas diferentes de evaluación. Mediante la administración del GHRP6 de forma concomitante a la intoxicación con el CCL₄, se evaluó la potencialidad del péptido de prevenir la aparición de la cirrosis. Esta fase de prevención recrea la condición clínica donde los pacientes se encuentran en riesgo de evolucionar a la cirrosis luego de un daño inicial al hígado. Por su parte, la fase de evaluación del efecto del GHRP6 en la reversión de la cirrosis se dividió en dos esquemas; uno donde el reto hepático se eliminó, y uno alternativo donde se mantuvo constante el insulto al hígado. Teniendo en cuenta el fenómeno de reversión espontánea, ampliamente descrito y estudiado en este modelo experimental (Issa y cols., 2004), el cual se produce al disminuir o eliminar la administración del CCL₄ a las ratas; la evaluación del efecto antifibrótico del GHRP6 en ausencia del CCL₄ se realizó durante 15 días solamente. De esta forma se evitó que se produjera una marcada resolución espontánea del proceso, a juzgar por la similitud encontrada en los principales indicadores de la enfermedad, entre los diferentes grupos de animales que recibieron el placebo (Tabla 11). La principal fortaleza de este estudio, sin precedentes en la literatura internacional, es haber ensayado el efecto del GHRP6 en la

reversión de la fibrosis empleando grupos experimentales estrictamente balanceados en términos de la severidad del daño hepático. Para ello se realizó una clasificación morfológica del grado de fibrosis del hígado antes de la aplicación del tratamiento (Anexo 14), de acuerdo con escalas validadas en la literatura internacional (Anthony y cols., 1977); además de las determinaciones habituales de los niveles de ambas transaminasas en el suero.

La biopsia hepática es sin duda el método más exacto para diagnosticar y evaluar la fibrosis del hígado, pero tiene la desventaja de ser un procedimiento muy invasivo (Mardini y Record, 2005). En la actualidad, el ultrasonido es la principal herramienta que se emplea en la clínica para realizar el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad (Vogt, 2005). Esta técnica imagenológica, de bajo costo, es capaz de detectar la cirrosis hepática basada en los cambios en la ecogenicidad, textura y nodularidad del hígado, así como diagnosticar la ascitis y las señales de la hipertensión portal. El Índice de Fibrosis por Ultrasonido (IFU) se utilizó en este ensayo como un indicador integral del daño en los hígados de las ratas. La realización de ultrasonidos hepáticos a los animales, tanto en la fase de prevención como de reversión, demostró que la severidad de la enfermedad se asoció al incremento del valor del IFU (Tabla 10). Los resultados obtenidos con esta técnica demostraron el efecto antifibrótico del GHRP6, en tanto que los animales tratados con el péptido presentaron los menores valores de IFU calculados en ambas fases del estudio.

La hipertensión portal es la manifestación clínica más frecuente en la cirrosis hepática, y es la causa principal de que aparezcan complicaciones como las varices gastroesofágicas o la ascitis (Zhu y Zhang, 2004). El aumento de la resistencia vascular intra-hepática en la cirrosis es causado precisamente por el exceso de matriz extracelular y la formación de nódulos, los que obstruyen y comprimen las estructuras vasculares del hígado (Schuster, 2003). Una de las principales limitaciones metodológicas de este estudio es no haber evaluado el efecto del GHRP6 sobre las presiones y el flujo de la vena Porta. Alternativamente, el incremento en el diámetro de la Porta es un indicador de la hipertensión portal (Liu y cols., 2002); el cual se evaluó en las ratas por ultrasonido. Los resultados obtenidos demostraron que los animales tratados con el GHRP6, en ambas fases del ensayo, mostraron menores diámetros de la vena Porta que los correspondientes grupos placebo (Tabla 10). Estos resultados coincidieron con la menor cantidad de animales con ascitis que se registró en los grupos tratados con el péptido (Tabla 10). Estos efectos positivos en la hemodinámica de la vena Porta y en la disminución de las ascitis, tanto en la fase de prevención

como de reversión de la enfermedad, pueden asociarse con la atenuación y regresión de la fibrosis del hígado inducida por el péptido GHRP6 (Tabla 11).

En un hígado fibrótico se detectan severas alteraciones tanto en la cantidad como en la composición de la matriz extracelular (MEC). La acumulación del material fibrótico resulta tanto del incremento de su síntesis como de la disminución de su degradación (Friedman, 2003). La tinción Tricrómica de Mallory permite identificar las proteínas de la MEC en el parénquima hepático. La misma es de gran utilidad para cuantificar la fibrosis, empleando metodologías de análisis morfométricos computarizados (Friedenberg y cols., 2005). Los resultados de la cuantificación del porcentaje de fibrosis indicaron una marcada reducción del depósito de MEC en todos los animales tratados con el GHRP6, en comparación con los respectivos grupos placebo (Tabla 11). En los tres esquemas de evaluación se observó también la disminución del grosor de los cordones fibróticos en los animales tratados con el péptido. El número de nódulos cirróticos es una de las principales mediciones de la fibrosis del hígado, ya que de forma intrínseca se evalúa en ella la presencia de cordones y la extensión de los mismos. Coincidentemente con la disminución del porcentaje de fibrosis se observó también una disminución de la nodularidad de los hígados de los animales tratados con el GHRP6, la cual fue más significativa mientras mayor fue el período de tratamiento con el péptido (Tabla 11). La reducción más marcada en términos del material fibrótico se asoció al esquema preventivo de tratamiento con el GHRP6, donde la mayoría de las muestras de hígado exhibieron una arquitectura absenta de la organización nodular característica de la enfermedad (Figura 24). Correspondientemente, el menor valor de IFU fue calculado para estos animales (Tabla 10). Este hecho resalta los efectos hepatoprotectores inducidos por el GHRP6, en orden de prevenir el daño al parénquima y en consecuencia el proceso fibrogénico. El esquema de intervención terapéutica corto, por 15 días, en ausencia del agente hepatotóxico, demostró una regresión significativa de la fibrosis hepática; expresada principalmente en términos del grosor de los cordones, así como en la reducción del acúmulo de colágeno en los sitios de depósito de MEC. En este caso, la reducción de la nodularidad del parénquima no fue significativa, aunque se apreció una tendencia a la disminución (Tabla 11). Esto parece estar relacionado con la brevedad del tratamiento. Es importante destacar que este efecto se observó en un escenario donde no se produjo una marcada resolución espontánea del proceso fibrótico; lo cual se evaluó comparando los mismos parámetros indicadores de la fibrosis entre los diferentes grupos que recibieron el placebo. Por su parte, en el esquema terapéutico por 60 días, a pesar de que se mantuvo presente el agente causal del daño hepático, se

detectó una reducción significativa de la nodularidad del parénquima en los animales tratados con el GHRP6, indicativo de la regresión de la enfermedad (Tabla 11).

Un resultado muy interesante fue la cuantificación de la grasa en los hígados. Las ratas tratadas con el GHRP6 de forma concomitante al CCL₄, durante cinco meses en total, exhibieron el mayor porcentaje de grasa hepática (Tabla 11). Un resultado similar se obtuvo para los animales tratados con el GHRP6 por 60 días, en los cuales se mantuvo constante el reto con el CCL₄. Por el contrario, se observó una reducción significativa de la inclusión de grasa en los animales tratados con el péptido por 15 días, durante los cuales no recibieron inyecciones de CCL₄. Estos resultados sugieren que el incremento en el fenotipo de hígado graso está asociado a la co-administración del CCL₄ y del GHRP6, pero no del péptido solamente. No existen reportes previos en la literatura que relacionen a los GHRP con el acúmulo de grasa en el hígado. Las intervenciones clínicas con el GHRP2 por largo tiempo, hasta ocho meses, han demostrado ser seguras en niños con enfermedades endocrinas (Mericq y cols., 1998). Además, los estudios de toxicidad de dosis repetidas (por 14 días), en ratas sanas, demostraron que el GHRP6 no provoca daños en el tejido hepático (Comunicación personal, Grupo de Estudios de Toxicología del Bioterio del CIGB). En cambio, el CCL₄ ejerce un marcado efecto inhibitorio sobre la exocitosis de las macromoléculas de las células hepáticas, como consecuencia de la unión covalente de sus metabolitos con los constituyentes de la célula, unido al daño oxidativo de las membranas celulares (Becker y cols., 1987; Poli y cols., 1990). Estos efectos tóxicos del CCL₄ se manifiestan desde las primeras administraciones a los animales, y son responsables de la acumulación inmediata de grasa observada en los hepatocitos (Boll y cols., 2001a). La Ciclina D1 interviene en la regulación del ciclo celular al facilitar la transición de fase G1 a S (Stacey, 2003). Con el estudio inmunohistoquímico de la expresión de esta proteína en los hígados cirróticos se demostró que en los animales tratados con el GHRP6 hay un incremento en el proceso de regeneración de los hepatocitos (Figura 27); lo cual, en presencia de la administración sostenida de CCL₄, puede estar contribuyendo al incremento del porcentaje de grasa en los hígados de los animales tratados con el péptido. Por otro lado, las evidencias recientes indican que los GHRP, a través del receptor CD36, activan los PPAR γ en macrófagos y adipocitos (Demers y cols., 2008). Estos receptores nucleares controlan la transcripción de muchos genes que intervienen en el metabolismo de los lípidos, incluyendo la lipogénesis, y en el almacenamiento de los mismos. Se ha demostrado que la sobre-expresión de la isoforma PPAR γ en el hígado provoca la esteatosis hepática adipogénica (Yu y cols., 2003). Estas evidencias de la literatura internacional

plantean la interrogante de si la administración prolongada del GHRP6 puede conducir a un fenotipo de hígado graso, mediado por la activación de la isoforma PPAR γ . Estudios adicionales sobre la inocuidad de un tratamiento prolongado con el GHRP6 son requeridos. No obstante, es válido destacar que el efecto antifibrótico del GHRP6 se manifiesta de forma independiente a la acumulación de grasa en el hígado (Tabla 11).

En cuanto a los marcadores bioquímicos del hígado, se debe resaltar nuevamente que ambas transaminasas mostraron un comportamiento bifásico a lo largo de la inducción de la enfermedad cirrótica. En el primer período del ensayo, tanto ALAT como ASAT se incrementaron significativamente, detectándose un valor máximo a los dos meses de intoxicación con el CCL₄ (Figura 25). A continuación, los niveles de estas enzimas disminuyeron en el suero, aún cuando se mantuvo constante la dosis y frecuencia de administraciones del CCL₄, y ocurrió una progresión en la severidad de la enfermedad. Esta primera fase de incremento en los niveles de transaminasas representa una fase aguda del daño inducido por el CCL₄, la cual se relacionó histológicamente con la esteatosis hepática. La posterior disminución de estas enzimas en el suero es indicativa de un fenómeno crónico, donde la severidad del daño ya no es representada por los niveles séricos de estas enzimas citosólicas de los hepatocitos. Varios autores han demostrado que los niveles de las enzimas hepáticas en el suero son pobres indicadores del grado de fibrosis, ya que no correlacionan con la cantidad de MEC de los hígados (Hayasaka y Saisho, 1998). Igual comportamiento bifásico se detectó para los animales tratados de forma concomitante con el GHRP6, aunque en este caso fue menor el valor cuantificado de ALAT y ASAT, indicando un efecto hepatoprotector inducido por el péptido (Figura 25). Al finalizar la fase de prevención del estudio, se observó un comportamiento diferencial de la ALAT para los animales tratados con el GHRP6, el cual puede relacionarse con el incremento de la esteatosis hepática demostrado anteriormente para este grupo (Tabla 11). En la fase de reversión, no se observaron diferencias en los niveles de las transaminasas en el séptimo mes del estudio (Tabla 13); lo cual puede estar relacionado también con el incremento de la grasa en los animales tratados con el GHRP6 por 60 días (Tabla 11). De hecho, la concentración de estas enzimas se redujo significativamente por el tratamiento con el GHRP6 en el esquema terapéutico por 15 días (Tabla 12); donde se demostró además la reducción del acúmulo de grasa en los hepatocitos (Tabla 11). De acuerdo a estos resultados, la inclusión de grasa en los hepatocitos parece ser el factor determinante del comportamiento de los niveles séricos de ambas transaminasas.

Además de las enzimas indicadoras del daño hepático, se evaluaron también en el suero los principales marcadores de la función de síntesis del hígado. Los resultados en la fase de prevención demostraron que los animales tratados con el GHRP6 mantuvieron valores superiores de síntesis hepática (Figura 25). Este resultado demuestra desde un punto de vista bioquímico, que el GHRP6 ejerció un marcado efecto hepatoprotector al ser administrado de forma concomitante al agente tóxico. Sin embargo, el tratamiento terapéutico con el GHRP6 no favoreció la concentración sérica de los parámetros indicadores de la actividad de síntesis del hígado (Tablas 12 y 13). En el caso del esquema terapéutico de 60 días, esto puede deberse a la continuidad de la intoxicación con el CCL₄. En cambio, en el esquema de tratamiento con el péptido por 15 días, y sin CCL₄, la ausencia de mejoría en la función metabólica del hígado puede deberse a que el corto período de tratamiento empleado no logró revertir significativamente la afectación inducida por el hepatotóxico de la maquinaria de exocitosis de los hepatocitos (Boll y cols., 2001b). Para ello sería necesario el recambio de las estructuras ya dañadas, mediado en gran medida por la regeneración del parénquima hepático (Chirkin y Konevalova, 1987; Oyagi y cols., 2006). Es posible por tanto, que un período de tratamiento con el GHRP6 más prolongado y en ausencia del agente hepatotóxico pueda traducirse en un mayor impacto terapéutico del péptido. Los resultados del estudio de MET apoyan esta idea, ya que en los animales tratados con el péptido se detectó mayor número de mitocondrias viables, así como evidencias de una importante actividad de síntesis; como es la presencia de gránulos de glucógeno en el citoplasma y de gran cantidad de retículo sarcoplasmático de aspecto fisiológico (Figura 29). Se requieren estudios adicionales para evaluar esta hipótesis.

El incremento de la actividad colagenolítica es el principal mecanismo de resolución de la fibrosis (Hemmann y cols., 2007). Los colágenos fibrilares (I y III) son degradados por la acción de las metaloproteasas intersticiales (MMP1, MMP8, y MMP13 en humanos, y MMP13 en roedores). En los animales tratados con el GHRP6 durante 15 días se demostró que el péptido favoreció los niveles de transcritos de la MMP13 (Figura 28). Este resultado se correlaciona con el menor porcentaje de colágeno presente en las muestras de los animales tratados con el péptido, en comparación con el grupo que recibió el placebo. Esto permite inferir que el mecanismo antifibrótico del GHRP6 involucra la degradación del colágeno a través de la activación de la MMP13.

La acumulación de material fibrótico ocurre como resultado del aumento en el número de células estrelladas hepáticas (CEH), en adición al incremento en su capacidad de síntesis y secreción de las

proteínas de MEC, cuando poseen un fenotipo de miofibroblasto. Se ha demostrado que la resolución de la fibrosis del hígado podría estar asociada también a la reversión del fenotipo miofibroblasto de las CEH al fenotipo quiescente, o por inducción de la muerte celular por apoptosis de las mismas (Elsharkawy y cols., 2005). La proteína α SMA constituye el principal marcador de las CEH activadas (Carpino y cols., 2005). La inmunolocalización de estas células se detectó mayoritariamente en los bordes laterales de los cordones fibróticos (Figura 26), lo cual pudiera explicar el incremento en el grosor de los cordones con la progresión de la enfermedad (Tabla 11). Los resultados obtenidos en el estudio de inmunohistoquímica para esta proteína demostraron que la administración del GHRP6, tanto de forma concomitante como terapéutica, disminuyó la cantidad de células marcadas positivamente para α SMA (Figura 26). Esta disminución del número de células que orquestan y efectúan la fibrosis, en respuesta al insulto hepático, es sin duda un gran aporte del tratamiento empleado, que pudiera asociarse con el efecto antifibrótico demostrado para el péptido GHRP6.

El TGF- β es la citocina fibrogénica por excelencia (Gressner y cols., 2002). Esta molécula es secretada por las CEH activadas, las células endoteliales sinusoidales y las células de Kupffer; y liberado por los trombocitos y los hepatocitos destruidos. El carácter profibrogénico del TGF- β se debe a que inicia la transdiferenciación de las CEH a miofibroblastos, aumenta la expresión de los genes de MEC, disminuye la degradación de la MEC por modulación negativa de las metaloproteinasas y regulación positiva de sus inhibidores específicos, induce la apoptosis de los hepatocitos e inhibe la proliferación de las células hepáticas (Gressner y Weiskirchen, 2006). El antagonismo del TGF- β o la inhibición de su cascada de señales intracelular por inhibidores específicos conlleva a un retardo significativo en la activación de las CEH y por tanto, a un sostenido efecto antifibrótico (Liu y cols., 2006). Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que la aplicación del GHRP6 redujo el cúmulo de TGF- β en forma de proteína madura, que se acumula en los cordones fibróticos mediante anclaje a las proteínas de la MEC (Figura 26). La administración durante 15 días del péptido disminuyó además los niveles de expresión transcripcional de esta molécula (Figura 28). Igualmente se demostró una disminución significativa a nivel de transcritos del CTGF, en los animales que recibieron el tratamiento con el GHRP6. Este factor de crecimiento, que es inducido por el TGF- β , media las acciones estimuladoras de éste sobre la síntesis de proteínas de MEC por las CEH activadas (Ihn, 2002).

Las células de Kupffer, principales orquestadoras de la respuesta inflamatoria en el hígado, son también de gran importancia en la fisiopatología de la cirrosis. La respuesta inflamatoria asociada al daño de los hepatocitos amplifica la generación de ERO, facilita el reclutamiento de más células inflamatorias, así como la liberación de citocinas profibrogénicas (Kawada y Otagawa, 2007). La vimentina es una proteína filamentosa que permite la identificación conjunta de las CEH y las células de Kupffer (Wu y cols., 1996; Geerts y cols., 2001). La observación de una menor cantidad de células positivas a vimentina en los animales tratados con el GHRP6, tanto en la fase de prevención como en la fase de reversión, indica que el tratamiento aplicado disminuyó el número de células que originan la respuesta inflamatoria y fibrogénica del hígado (Figura 27). El empleo de un anticuerpo monoclonal contra p53 permitió también el marcaje específico de estas dos formas celulares, presentes tanto en los cordones como en el parénquima; el cual fue superior en número en los animales tratados con el GHRP6 (Figura 27). Este resultado es indicador de la inhibición de la proliferación o de la apoptosis de estas células (Das y cols., 2008). En cualquiera de los casos, estos efectos pueden explicar la menor cantidad de ambas formas celulares detectada en los animales tratados con el GHRP6, lo cual puede asociarse también al efecto antifibrótico del péptido.

Los mecanismos moleculares que subyacen bajo los efectos de citoprotección ejercidos por el GHRP6 en el miocardio, en el hígado, así como en el resto de los tejidos que se evaluaron, son desconocidos actualmente. El IGF-1, principal mediador sistémico de las acciones de la GH, tiene un papel muy importante durante el desarrollo cardíaco y en el mantenimiento de la estructura y función del corazón (Maison y Chanson, 2006). Los datos experimentales evidencian que la activación del eje GH/IGF-1 favorece el funcionamiento cardíaco en modelos de infarto en ratas (Tivesten y cols., 2001). Pacientes con MCD han sido tratados también con la GH, observándose una mejoría sustancial tanto en la función del ventrículo izquierdo como en la capacidad de realizar ejercicio (Isgaard, 2004). El 90% del IGF-1 circulante se origina en el hígado, donde ejerce acciones autocrinas y paracrinas, además de sus conocidos efectos endocrinos en múltiples tejidos (Conchillo y cols., 2007). Existen reportes en la literatura sobre el efecto hepatoprotector del IGF-1 en episodios de I/R hepática (Harada y cols., 2008). Otros autores han demostrado también que el IGF-1 ejerce marcados efectos antifibróticos en el modelo de intoxicación con CCL₄ en ratas (Sanz y cols., 2005).

Teniendo en cuenta que estas propiedades terapéuticas referidas en la literatura para el IGF-1, son similares a las detectadas para el péptido GHRP6; se evaluó la participación de este factor de

crecimiento en los modelos experimentales de daño agudo por I/R desarrollados en la tesis. Los resultados obtenidos en el modelo porcino de IMA demostraron que el tratamiento con el GHRP6 no aumentó significativamente la expresión transcripcional del gen IGF-1, a las 72 horas post-infarto, en comparación con el grupo placebo (Figura 7). Esto sugiere que el efecto ejercido por el GHRP6 en la reducción de la talla final del IMA se debe a una acción directa del péptido sobre el músculo cardiaco, y no a su actividad endocrina. Otros autores también han demostrado la existencia de una ruta de acción directa para los secretagogos en el miocardio, independiente de la acción del eje GH/IGF-1. Los experimentos realizados en ratas con deficiencias en la secreción de la GH, por envejecimiento o por hipofisectomía (Locatelli y cols., 1999), demuestran claramente la existencia de efectos cardioprotectores directos de la hexarelina ante el daño funcional inducido por la isquemia; los que además son más efectivos que si se emplea una terapia de reemplazo con la GH. En el modelo de infarto en perros, de Shen y colaboradores, se demostró que el incremento en la sobrevivencia de los animales tratados con el GHRP6 se debió al aumento de la contractilidad segmentaria del miocardio en las zonas no isquémicas, como mecanismo compensatorio; el cual no se evidenció en los animales tratados con la GH, donde la mortalidad fue igual que en el grupo placebo (Shen y cols., 2003b). En el estudio de I/R del hígado se demostró, al igual que en el miocardio, que la aplicación profiláctica del GHRP6 no provocó un incremento significativo en la expresión transcripcional del gen IGF-1, al menos durante el período de tiempo ensayado (Figura 23). Este resultado sugiere también la posibilidad de que los mecanismos que median la acción hepatoprotectora ejercida por el GHRP6 no estén mediados por el eje GH/IGF-1.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y los referidos por otros autores apuntan a que, independientemente de que los efectos del eje GH/IGF-1 puedan estar presentes en la intervención farmacológica con los GHRP, como en el caso de los esquemas de administración reiterada; las acciones citoprotectoras sistémicas demostradas para estos péptidos son ejercidas también de forma directa sobre los tejidos u órganos blancos. En este sentido, es posible hipotetizar sobre la existencia de al menos un mecanismo molecular común, que se manifieste en todas las células del organismo, cuando se administran los GHRP de forma sistémica. Teniendo en cuenta que en el tejido hepático no se expresa el receptor GHS-R1a (Gnanapavan y cols., 2002; Thielemans y cols., 2007), este mecanismo común de citoprotección pudiera relacionarse con la demostrada unión de estos péptidos al receptor CD36 (Demers y cols., 2004), que se expresa de forma ubicua en el organismo (Febbraio y cols., 2001). Por otro lado, existen evidencias recientes en la literatura

internacional que permiten relacionar al CD36 con las acciones moleculares del GHRP6 demostradas en este trabajo de tesis, las cuales se explican a continuación, y se representan de manera esquemática en la Figura 30.

Los estudios realizados en el tejido hepático indicaron que el péptido GHRP6 induce la expresión transcripcional de las quinasas PI3K/PKB (Figura 23). Esto indica la activación de las rutas de señales que median estas enzimas (Figura 30), las que regulan numerosas funciones fisiológicas, como la supervivencia y proliferación celular, la re-organización del citoesqueleto, el metabolismo de la glucosa, entre otras (Duronio, 2008). En particular, la PKB es considerada una enzima crítica para la supervivencia celular, pues mediante la fosforilación de varias proteínas reguladoras, incluyendo la Glucógeno-Sintasa Quinasa-3 β (GSK3 β), Caspasa 9 y Bad; es capaz de inhibir la salida del Citocromo C (Cyt C) de la mitocondria y la consecuente cascada de activación de las caspasas, principales efectoras de la muerte celular programada (Figura 30).

Adicionalmente, la PKB incrementa la supervivencia celular aumentando la expresión de factores anti-apoptóticos como Bcl-2 (Duronio, 2008). En el modelo animal de MCD inducida por la DX, se evaluó la expresión transcripcional de los genes Bcl-2 y Bax (Figura 16). Estos oncogenes interactúan también con la mitocondria y modulan, de forma contraria, la transducción de señales inducidas por diversos estímulos que liberan el Citocromo C de la mitocondria y activan la apoptosis. La proteína Bcl-2 se comporta como un factor de supervivencia mientras que la proteína Bax promueve la apertura del poro mitocondrial, comportándose como una molécula pro-apoptótica (Thomadaki y Scorilas, 2006). La relación de expresión Bcl-2/Bax es, por tanto, un indicador importante de la atenuación de la apoptosis y de la probabilidad de supervivencia de la célula. Los resultados mostraron que la administración concomitante del GHRP6 durante el período de intoxicación con la DX provocó un incremento de la relación transcripcional de Bcl-2/Bax, en comparación con los animales del grupo Placebo. Este resultado es indicativo de la atenuación de la apoptosis inducida por la administración del GHRP6 (Figura 30). En un modelo de fallo cardíaco crónico por sobrecarga de presión desarrollado recientemente en ratas, se demostró igualmente que el tratamiento con los GHRP suprime la apoptosis de los cardiomiocitos (Xu y cols., 2005). Estos autores reportan también que los GHRP mejoran el desbalance de Bcl-2 y Bax, así como disminuyen la activación de la caspasa 3 y los niveles de p38MAPK, principales agentes efectoras e inductores, respectivamente, de la apoptosis.

La activación de la ruta PI3K/PKB media también la inducción de la sobrevida celular en los macrófagos, cuando estos captan las lipoproteínas oxidadas, a través del receptor CD36 (Hundal y cols., 2001). Teniendo en cuenta que los GHRP comparten el mismo sitio de unión en este receptor que las lipoproteínas oxidadas (Demers y cols., 2004); se puede inferir que mediante la unión del GHRP6 al CD36 se induce también la activación de la ruta PI3K/PKB, así como el consecuente incremento en la expresión de Bcl-2 (Figura 30). No obstante, esta hipótesis requiere ser evaluada con estudios adicionales.

Se demostró también que el GHRP6 incrementó los niveles de transcritos de HIF-1 α al finalizar la reperusión del hígado (Figura 23). Este gen se conoce como el principal factor regulador de la homeostasis del oxígeno, pues se activa en condiciones de isquemia y promueve la expresión de genes dirigidos a favorecer la oxigenación tisular, el metabolismo energético, la proliferación y la viabilidad celular (Ke y Costa, 2006). La activación del HIF-1 α puede ser mediada por la ruta PI3K/PKB, conformando una de las vías principales del abanico de señales inductoras de sobrevida que median estas quinasas (Belaiba y cols., 2007; Li y cols., 2008). Por tanto, la interacción del péptido GHRP6 con el receptor CD36 puede estar también involucrado en el incremento transcripcional de HIF-1 α en la células sometidas al insulto isquémico.

El empleo de agentes antioxidantes es una de las principales estrategias para prevenir y atenuar las enfermedades cardiovasculares y hepáticas. Los diferentes estudios experimentales abordados en este trabajo de tesis incluyeron la caracterización del efecto inducido por el GHRP6 en el estado redox celular; lo cual no se había descrito con anterioridad. En los modelos de daño por I/R, tanto del miocardio (Figura 6), como del hígado (Tabla 9), la administración del GHRP6 se asoció con el incremento significativo de la actividad total de la SOD. Esta enzima, unida a la acción de la Catalasa, constituyen un mecanismo eficiente de eliminación de los radicales superóxido que se generan por la isquemia en ambos órganos (Figura 30); lo cual se demostró por los niveles de hidroperóxidos totales prácticamente fisiológicos que se detectaron en ambos tejidos, en los animales tratados con el péptido. En los modelos de enfermedad crónica, donde se administró el GHRP6 en dosis repetidas, además del incremento en la actividad de la SOD, se detectó también el aumento de actividad de la enzima Catalasa (Figura 15 y Tabla 14). Esto último parece ser independiente del tratamiento con el péptido, ya que se produjo también en los animales que recibieron el placebo, posiblemente como consecuencia del aumento en los niveles de hidroperóxidos totales (regulación por sustrato) (Sen y cols., 2003). La regulación positiva de la

actividad total de la SOD inducida por el GHRP6 se debe principalmente al incremento transcripcional de la isoforma SODMn, lo cual se demostró en los animales cirróticos tratados con el péptido (Figura 28). Este aumento de actividad de la SODMn se produjo incluso en animales sanos que recibieron una administración única del GHRP6 (Tabla 9); lo que indica el potencial efecto antioxidante de este péptido.

El mecanismo por el cual el GHRP6 incrementa los niveles de transcripción genética de la enzima SODMn involucra al menos un factor de transcripción. El PPAR γ es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción y promueve la expresión de determinados blancos genéticos. Mediante el empleo de animales transgénicos “Knock Out” se demostró que la presencia de PPAR γ es crítica para el mantenimiento de la homeostasis redox en el miocardio (Ding y cols., 2007). Está descrito también, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la activación de PPAR γ en células endoteliales aumenta la expresión y estimula la actividad de ambas isoformas de la enzima SOD; además de que disminuye la producción del radical superóxido mediado por la enzima NADPH-oxidasa (Hwang y cols., 2005). En la línea celular de hepatoma HepG2, la estimulación de los receptores PPAR γ conduce a la estimulación específica de la transcripción de la isoforma SODMn (Becuwe y cols., 1999). De acuerdo con estos antecedentes de la literatura internacional, la activación transcripcional específica de la isoforma SODMn inducida por el GHRP6 puede ser mediada por la activación de los PPAR γ , tanto en el hígado como en el miocardio; pues se sabe que estos receptores nucleares se activan luego de la interacción de los secretagogos con el CD36 (Figura 30) (Demers y cols., 2008). De hecho, se conoce que la ruta PI3K/PKB media también la activación del PPAR γ inducida por la interacción de las lipoproteínas oxidadas con el receptor CD36 (Munteanu y cols., 2006). De esta forma, queda inferida la posibilidad de que la interacción del GHRP6 con el CD36 facilite también la activación del PPAR γ por mediación de la ruta PI3K/PKB, y con ello el incremento de la transcripción de la enzima antioxidante SODMn (Figura 30). Estudios adicionales son también requeridos para comprobar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta que el mecanismo propuesto en el esquema de la Figura 30 requiere demostraciones adicionales, se debe considerar la posibilidad de que existan rutas moleculares alternativas. Recientemente se demostró, tanto *in vitro* como *in vivo*, el efecto antioxidante de la ghrelina. Teniendo en cuenta que esta molécula (análogo natural de los GHRP) no está relacionada con el CD36, este resultado indica la existencia de un posible mecanismo molecular alternativo para el efecto antioxidante de los GHRP (El Eter y cols., 2007). Otros autores demostraron que tanto la

ghrelina como la hexarelina son capaces de inhibir la apoptosis de los cardiomiocitos y las células endoteliales, *in vitro*, a través de la activación de al menos dos rutas de señalización intracelular promotoras de supervivencia, la ERK1/2 y la propia PI3K/PKB (Baldanzi y cols., 2002). En estos estudios se demostró también que el GHSR-Ia no se expresa en los cardiomiocitos H9c2. Teniendo en cuenta que la ghrelina no es ligando del receptor CD36 (Bodart y cols., 2002), estos resultados sugieren la hipótesis de que la actividad anti-apoptótica de los GHRP y su ligando natural puede no ser mediada por el GHSR-Ia, ni el CD36, sino por la activación de otro receptor común, no identificado aún (Figura 30).

Tanto la atenuación del daño inducido por el estrés oxidativo como la inducción de las rutas de supervivencia, son respuestas biológicas que conducen a la protección de la integridad de la mitocondria, pues de ella depende el destino final de la célula. El éxito de un agente citoprotector puede por tanto ser evaluado en base a la capacidad de atenuar el daño mitocondrial. Los resultados de los estudios por microscopía electrónica de transmisión indicaron, tanto en el tejido cardíaco como en los hepatocitos, que la administración del péptido GHRP6 favoreció la integridad de las mitocondrias (Figuras 17 y 29); indicando la capacidad citoprotectora de esta molécula.

Los efectos obtenidos con el GHRP6 en la atenuación del daño a los cardiomiocitos y hepatocitos, tanto en situaciones de daño agudo por I/R como en presencia de agentes tóxicos, disminuyen la magnitud de la respuesta inflamatoria a instaurar en el tejido dañado. La citoprotección multiorgánica ejercida por el GHRP6 puede asociarse a la disminución del infiltrado inflamatorio y de la actividad de la enzima MPO que se detectó en los animales tratados con el péptido (Figura 22). Estudios recientes demuestran que el péptido análogo GHRP2 es capaz de disminuir la liberación de TNF α por células no parenquimatosas en un modelo de daño hepático inducido por LPS (Granado y cols., 2008), lo cual complementa de forma relevante los resultados obtenidos con el GHRP6 en la prevención del DMO (Figuras 19 y 20). La ruta del Fas-L, en su interacción con el Fas-R que se expresa en los hepatocitos, es uno de los principales mecanismos mediante el cual las células de Kupffer activadas inducen apoptosis en los hepatocitos (Yang y cols., 2004a). La demostración de que los animales tratados con el GHRP6 muestran menor expresión de Fas-L en las células de Kupffer que los grupos placebo (Figura 27), indica que el péptido atenúa la activación de las células de Kupffer; además de disminuir su número por inducción de arresto o por apoptosis. Es decir, el GHRP6 desmantela el proceso necro-inflamatorio del hígado, con lo cual induce un marcado efecto hepatoprotector y antifibrótico. La menor presencia de infiltrado inflamatorio que se detectó en las

muestras del miocardio de los cerdos tratados con el GHRP6 (Figura 4), corroboran el efecto anti-inflamatorio del péptido, lo cual complementa sus acciones citoprotectoras.

En resumen, en este trabajo de tesis se demuestra la potencialidad terapéutica del péptido GHRP6 en modelos animales de enfermedades cardiovasculares y hepáticas, relevantes por su morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La aplicación profiláctica y terapéutica de esta molécula permitió disminuir los daños agudos inducidos por la I/R en ambos órganos, así como prevenir y revertir, respectivamente, enfermedades crónicas como la Miocardiopatía Dilatada y la Cirrosis Hepática. Los mecanismos moleculares de la acción citoprotectora del péptido GHRP6 involucran su influencia favorable sobre el balance redox celular, así como la inducción de rutas de señales que previenen el daño mitocondrial, con lo cual se favorece la supervivencia de las células en los diferentes tejidos y órganos.

CONCLUSIONES

1. La administración del GHRP6 durante la isquemia del miocardio y en las primeras horas de la reperfusión, permite reducir eficazmente la talla final del IMA; sin atenuar ni exacerbar la aparición y severidad de los eventos arrítmicos asociados al infarto.
2. El tratamiento profiláctico y terapéutico con el GHRP6 en la MCD inducida por la DX, permite la prevención y reversión, respectivamente, de la disfunción sistólica y del remodelado ventricular que caracteriza a la enfermedad, reduciendo así la mortalidad.
3. El empleo de una administración única y profiláctica del GHRP6, favorece la supervivencia de los hepatocitos ante el daño inducido por un episodio de I/R del hígado, y atenúa la instauración del síndrome de DMO.
4. La administración profiláctica y terapéutica del GHRP6 en la Cirrosis Hepática inducida por el CCL₄ disminuye la fibrosis del hígado, independientemente de la acumulación de grasa en el parénquima hepático.
5. El GHRP6 favorece el estado redox celular mediante el incremento de los sistemas de defensa antioxidante de las células, específicamente la enzima SODMn, tanto en situaciones patológicas como en condiciones fisiológicas.
6. Los efectos citoprotectores demostrados para el GHRP6 involucran la participación de las rutas inductoras de supervivencia celular de las quinasas PI3K/PKB y del HIF-1 α ; el incremento en la relación de Bcl-2/Bax y la preservación de la estructura de las mitocondrias.
7. El efecto hepatoprotector del péptido GHRP6 favorece la reducción de la fibrosis del hígado mediante el incremento de la actividad colagenolítica de la enzima MMP13, la disminución de las citocinas profibrogénicas TGF β y CTGF, y la atenuación de las CEH y las células de Kupffer con fenotipo activado.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios para establecer la dosis y la forma de administración óptima del GHRP6 para disminuir la talla final del IMA.
2. Explorar la influencia del GHRP6 en los perfiles de expresión de citocinas proinflamatorias (especialmente TNF- α e IL-6), y de moléculas de adhesión, en células inflamatorias y endoteliales respectivamente.
3. Evaluar los efectos de la administración prolongada del péptido GHRP6 en animales sanos en cuanto a la aparición de acúmulo de grasa en el hígado.
4. Estudiar la participación del sistema Glutación peroxidasa-Glutación reductasa en el efecto demostrado para el GHRP6 sobre el balance redox celular.
5. Determinar la participación del receptor CD36 en los efectos citoprotectores mediados por el GHRP6, así como en las acciones del péptido sobre el estado redox celular.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Abou El Hassan,M.A., Heijn,M., Rabelink,M.J., van der Vijgh,W.J., Bast,A., and Hoeben,R.C. **(2003)**. The protective effect of cardiac gene transfer of CuZn-sod in comparison with the cardioprotector monohydroxyethylrutoside against doxorubicin-induced cardiotoxicity in cultured cells. *Cancer Gene Ther.* 10, 270-277.
2. Abs,R. **(2003)**. Update on the diagnosis of GH deficiency in adults. *Eur. J. Endocrinol.* 148 Suppl 2, S3-S8.
3. Afanas'ev,I.B. **(2007)**. Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Mol. Biotechnol.* 37, 2-4.
4. Ajamieh,H., Merino,N., Candelario-Jalil,E., Menendez,S., Martinez-Sanchez,G., Re,L., Giuliani,A., and Leon,O.S. **(2002)**. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Res.* 45, 333-339.
5. Ajamieh,H.H., Berlanga,J., Merino,N., Sanchez,G.M., Carmona,A.M., Cepero,S.M., Giuliani,A., Re,L., and Leon,O.S. **(2005)**. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transpl. Int.* 18, 604-612.
6. Alvarez,G.C., Madrid-Marina,V., Jimenez-Mendez,R., Buitimea,A.L., Roman,M.B., Cortez-Gomez,R., Esparza,J.R., and Rodriguez-Fragoso,L. **(2007)**. Combined therapy with danazol, pegylated interferon, and ribavirin improves thrombocytopenia and liver injury in rats with fibrosis. *Ann. Hepatol.* 6, 233-241.
7. Ammar,K.A., Kors,J.A., Yawn,B.P., and Rodeheffer,R.J. **(2004)**. Defining unrecognized myocardial infarction: a call for standardized electrocardiographic diagnostic criteria. *Am. Heart J.* 148, 277-284.
8. Anderson,L.L., Jeftinija,S., and Scanes,C.G. **(2004)**. Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 229, 291-302.
9. Anderson,L.L., Jeftinija,S., Scanes,C.G., Stromer,M.H., Lee,J.S., Jeftinija,K., and Glavaski-Joksimovic,A. **(2005)**. Physiology of ghrelin and related peptides. *Domest. Anim Endocrinol.* 29, 111-144.
10. Andreka,G., Vertesaljai,M., Szantho,G., Font,G., Piroth,Z., Fontos,G., Juhasz,E.D., Szekely,L., Szelid,Z., Turner,M.S., Ashrafiyan,H., Frenneaux,M.P., and Andreka,P. **(2007)**. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* 93, 749-752.
11. Anjo,A., Levi,F., and Reynes,M. **(1991)**. [Contribution of electron microscopy to the study of anthracycline cardiotoxicity]. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy.)* 75, 7-9.
12. Anthony,P.P., Ishak,K.G., Nayak,N.C., Poulsen,H.E., Scheuer,P.J., and Sobin,L.H. **(1977)**. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull. World Health Organ* 55, 521-540.
13. Antman,E.M., Hand,M., Armstrong,P.W., Bates,E.R., Green,L.A., Halasyamani,L.K., Hochman,J.S., Krumholz,H.M., Lamas,G.A., Mullany,C.J., Pearle,D.L., Sloan,M.A., Smith,S.C., Jr., Anbe,D.T.,

- Kushner,F.G., Ornato,J.P., Pearle,D.L., Sloan,M.A., Jacobs,A.K., Adams,C.D., Anderson,J.L., Buller,C.E., Creager,M.A., Ettinger,S.M., Halperin,J.L., Hunt,S.A., Lytle,B.W., Nishimura,R., Page,R.L., Riegel,B., Tarkington,L.G., and Yancy,C.W. (2008). 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 210-247.
14. Anuario Estadístico de Cuba (2007). *Dirección Nacional de Estadística de Cuba* <http://www.sld.cu/servicios/estadisticas/>.
 15. Arii,S., Teramoto,K., and Kawamura,T. (2003). Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* 10, 189-194.
 16. Arola,O.J., Saraste,A., Pulkki,K., Kallajoki,M., Parvinen,M., and Voipio-Pulkki,L.M. (2000). Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Res.* 60, 1789-1792.
 17. Arthur,M.J. (2002). Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 122, 1525-1528.
 18. Arvat,E., Di Vito,L., Maccagno,B., Broglio,F., Boghen,M.F., Deghenghi,R., Camanni,F., and Ghigo,E. (1997). Effects of GHRP-2 and hexarelin, two synthetic GH-releasing peptides, on GH, prolactin, ACTH and cortisol levels in man. Comparison with the effects of GHRH, TRH and hCRH. *Peptides* 18, 885-891.
 19. Babior,B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109, 33-44.
 20. Bagchi,D., Bagchi,M., Hassoun,E.A., Kelly,J., and Stohs,S.J. (1995). Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology* 95, 1-9.
 21. Baldanzi,G., Filigheddu,N., Cutrupi,S., Catapano,F., Bonisconi,S., Fubini,A., Malan,D., Baj,G., Granata,R., Broglio,F., Papotti,M., Surico,N., Bussolino,F., Isgaard,J., Deghenghi,R., Sinigaglia,F., Prat,M., Muccioli,G., Ghigo,E., and Graziani,A. (2002). Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J. Cell Biol.* 159, 1029-1037.
 22. Barber,K., Blackwell,J., Collett,D., and Neuberger,J. (2007). Life expectancy of adult liver allograft recipients in the UK. *Gut* 56, 279-282.
 23. Barisione,G., Fontana,L., Cottalasso,D., Domenicotti,C., Pronzato,M.A., and Nanni,G. (1993). [Changes in lipoglycoprotein metabolism in toxic fatty liver]. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 39, 101-112.
 24. Bartoszek,A. (2002). Metabolic activation of adriamycin by NADPH-cytochrome P450 reductase; overview of its biological and biochemical effects. *Acta Biochim. Pol.* 49, 323-331.
 25. Bayes,d.L. (2007). Location of Q-wave myocardial infarction in the era of cardiac magnetic resonance imaging techniques: an update. *J. Electrocardiol.* 40, 69-71.

26. Bayne,K. (1998). Developing guidelines on the care and use of animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862, 105-110.
27. Becker,E., Messner,B., and Berndt,J. (1987). Two mechanisms of CCl₄-induced fatty liver: lipid peroxidation or covalent binding studied in cultured rat hepatocytes. *Free Radic. Res. Commun.* 3, 299-308.
28. Becuwe,P., Bianchi,A., Keller,J.M., and Dauca,M. (1999). Effects of the peroxisome proliferator clofibric acid on superoxide dismutase expression in the human HepG2 hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1025-1033.
29. Belaiba,R.S., Bonello,S., Zahringer,C., Schmidt,S., Hess,J., Kietzmann,T., and Gorlach,A. (2007). Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 4691-4697.
30. Benso,A., Broglio,F., Marafetti,L., Lucatello,B., Seardo,M.A., Granata,R., Martina,V., Papotti,M., Muccioli,G., and Ghigo,E. (2004). Ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues are cardioactive molecules with identities and differences. *Semin. Vasc. Med.* 4, 107-114.
31. Berti,F., Muller,E., De,G.C., V, and Rossoni,G. (1998). Hexarelin exhibits protective activity against cardiac ischaemia in hearts from growth hormone-deficient rats. *Growth Horm. IGF. Res.* 8 Suppl B, 149-152.
32. Bisi,G., Podio,V., Valetto,M.R., Broglio,F., Bertuccio,G., Del Rio,G., Arvat,E., Boghen,M.F., Deghenghi,R., Muccioli,G., Ong,H., and Ghigo,E. (1999). Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *J. Endocrinol. Invest* 22, 266-272.
33. Bjarnason,G.A., Charpentier,D., Wong,R., Goel,R., Douglas,L., Walsh,W., Matthews,S., Dent,S., Seymour,L., and Winquist,E. (2005). Phase I study of Tomudex and Doxorubicin in patients with locally advanced, inoperable or metastatic cancer (IND.98). *Invest New Drugs* 23, 51-56.
34. Bjelogrljic,S.K., Radic,J., Jovic,V., and Radulovic,S. (2005). Activity of d,l-alpha-tocopherol (vitamin E) against cardiotoxicity induced by doxorubicin and doxorubicin with cyclophosphamide in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97, 311-319.
35. Blokhina,O., Virolainen,E., and Fagerstedt,K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot. (Lond)* 91 Spec No, 179-194.
36. Bodart,V., Bouchard,J.F., McNicoll,N., Escher,E., Carriere,P., Ghigo,E., Sejlitz,T., Sirois,M.G., Lamontagne,D., and Ong,H. (1999). Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ. Res.* 85, 796-802.
37. Bodart,V., Febbraio,M., Demers,A., McNicoll,N., Pohankova,P., Perreault,A., Sejlitz,T., Escher,E., Silverstein,R.L., Lamontagne,D., and Ong,H. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ. Res.* 90, 844-849.
38. Boll,M., Weber,L.W., Becker,E., and Stampfl,A. (2001a). Pathogenesis of carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury bioactivation of CCl₄ by cytochrome P450 and effects on lipid homeostasis. *Z. Naturforsch. [C.]* 56, 111-121.

39. Boll,M., Weber,L.W., Becker,E., and Stampfl,A. **(2001b)**. Hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride: inhibited lipoprotein secretion and changed lipoprotein composition. *Z. Naturforsch. [C.]* 56, 283-290.
40. Bosetti,C., Levi,F., Lucchini,F., Zatonski,W.A., Negri,E., and La Vecchia,C. **(2007)**. Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J. Hepatol.* 46, 827-839.
41. Bowers,C.Y. **(1998)**. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol. Life Sci.* 54, 1316-1329.
42. Bowers,C.Y., Momany,F.A., Reynolds,G.A., and Hong,A. **(1984)**. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 114, 1537-1545.
43. Bowers,C.Y., Reynolds,G.A., Durham,D., Barrera,C.M., Pezzoli,S.S., and Thorner,M.O. **(1990)**. Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 70, 975-982.
44. Braunwald E **(2005)**. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. USA, 7th edition.
45. Brembilla-Perrot,B. **(2007)**. [Dilated cardiomyopathy and syncope: management]. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* 100, 782-786.
46. Brodie,B.R., Webb,J., Cox,D.A., Qureshi,M., Kalynych,A., Turco,M., Schultheiss,H.P., Dulas,D., Rutherford,B., Antonucci,D., Stuckey,T., Krucoff,M., Gibbons,R., Lansky,A., Na,Y., Mehran,R., and Stone,G.W. **(2007)**. Impact of time to treatment on myocardial reperfusion and infarct size with primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction (from the EMERALD Trial). *Am. J. Cardiol.* 99, 1680-1686.
47. Broglio,F., Benso,A., Valetto,M.R., Gottero,C., Quaranta,L., Podio,V., Arvat,E., Bobbio,M., Bisi,G., and Ghigo,E. **(2001)**. Growth hormone-independent cardiotropic activities of growth hormone-releasing peptides in normal subjects, in patients with growth hormone deficiency, and in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *Endocrine.* 14, 105-108.
48. Broglio,F., Prodam,F., Me,E., Riganti,F., Lucatello,B., Granata,R., Benso,A., Muccioli,G., and Ghigo,E. **(2005)**. Ghrelin: endocrine, metabolic and cardiovascular actions. *J. Endocrinol. Invest* 28, 23-25.
49. Burger,A.G., Monson,J.P., Colao,A.M., and Klibanski,A. **(2006)**. Cardiovascular risk in patients with growth hormone deficiency: effects of growth hormone substitution. *Endocr. Pract.* 12, 682-689.
50. Buss,J.L., Greene,B.T., Turner,J., Torti,F.M., and Torti,S.V. **(2004)**. Iron chelators in cancer chemotherapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 1623-1635.
51. Byrne,J.A., Grieve,D.J., Cave,A.C., and Shah,A.M. **(2003)**. Oxidative stress and heart failure. *Arch. Mal Coeur Vaiss.* 96, 214-221.
52. Carmeliet,E. **(1999)**. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 79, 917-1017.

53. Carpino,G., Morini,S., Ginanni,C.S., Franchitto,A., Merli,M., Siciliano,M., Gentili,F., Onetti,M.A., Berloco,P., Rossi,M., Attili,A.F., and Gaudio,E. **(2005)**. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig. Liver Dis.* 37, 349-356.
54. Cassoni,P., Allia,E., Marrocco,T., Ghe,C., Ghigo,E., Muccioli,G., and Papotti,M. **(2006)**. Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line. *J. Endocrinol. Invest* 29, 781-790.
55. Castro,A.I., Lage,M., Peino,R., Kelestimur,F., Dieguez,C., and Casanueva,F.F. **(2007)**. A single growth hormone determination 30 minutes after the administration of the GHRH plus GHRP-6 test is sufficient for the diagnosis of somatotrope dysfunction in patients who have suffered traumatic brain injury. *J. Endocrinol. Invest* 30, 224-229.
56. Cenci,M.C., Conceicao,F.L., Soares,D.V., Spina,L.D., Brasil,R.R., Lobo,P.M., Michmacher,E., and Vaisman,M. **(2008)**. Impact of 5 years of growth hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in growth hormone-deficient adults. *Metabolism* 57, 121-129.
57. Chalenko,V.V. **(1998)**. [Classification of acute dysfunctions of organs and systems in multiple organ failure syndrome]. *Anesteziol. Reanimatol.* 25-30.
58. Chirkin,A.A. and Konevalova,N.I. **(1987)**. [Effect of proliferation-stimulating factors on cholesterol esterification in the serum of rats with acute tetrachloromethane poisoning]. *Vopr. Med. Khim.* 33, 124-128.
59. Chiu,C.J., McArdle,A.H., Brown,R., Scott,H.J., and Gurd,F.N. **(1970)**. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch. Surg.* 101, 478-483.
60. Chuang,M.L., Hibberd,M.G., Salton,C.J., Beaudin,R.A., Riley,M.F., Parker,R.A., Douglas,P.S., and Manning,W.J. **(2000)**. Importance of imaging method over imaging modality in noninvasive determination of left ventricular volumes and ejection fraction: assessment by two- and three-dimensional echocardiography and magnetic resonance imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 35, 477-484.
61. Colletti,L.M. and Green,M. **(2001)**. Lung and liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat is increased by exogenous lipopolysaccharide which also increases hepatic TNF production in vivo and in vitro. *Shock* 16, 312-319.
62. Conchillo,M., Prieto,J., and Quiroga,J. **(2007)**. [Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis]. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99, 156-164.
63. Conley,L.K., Teik,J.A., Deghenghi,R., Imbimbo,B.P., Giustina,A., Locatelli,V., and Wehrenberg,W.B. **(1995)**. Mechanism of action of hexarelin and GHRP-6: analysis of the involvement of GHRH and somatostatin in the rat. *Neuroendocrinology* 61, 44-50.
64. Cooper,D., Stokes,K.Y., Taylor,A., and Granger,D.N. **(2002)**. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc. Toxicol.* 2, 165-180.
65. Coyle,J.T. and Puttfarcken,P. **(1993)**. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695.

-
66. Cutler,J.A., Thom,T.J., and Roccella,E. **(2006)**. Leading causes of death in the United States. *JAMA* 295, 383-384.
 67. Das,S., Boswell,S.A., Aaronson,S.A., and Lee,S.W. **(2008)**. P53 promoter selection: choosing between life and death. *Cell Cycle* 7, 154-157.
 68. De Minicis,S. and Brenner,D.A. **(2007)**. NOX in liver fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 266-272.
 69. De,G.C., V, Rossoni,G., Bernareggi,M., Muller,E.E., and Berti,F. **(1997)**. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur. J. Pharmacol.* 334, 201-207.
 70. del Monte,F., Lebeche,D., Guerrero,J.L., Tsuji,T., Doye,A.A., Gwathmey,J.K., and Hajjar,R.J. **(2004)**. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 5622-5627.
 71. Demers,A., McNicoll,N., Febbraio,M., Servant,M., Marleau,S., Silverstein,R., and Ong,H. **(2004)**. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem. J.* 382, 417-424.
 72. Demers,A., Rodrigue-Way,A., and Tremblay,A. **(2008)**. Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. *PPAR. Res.* 2008, 364784.
 73. Di Napoli,P., Taccardi,A.A., Grilli,A., Felaco,M., Di Gioacchino,L., De Caterina,R., and Barsotti,A. **(2002)**. Verapamil reduces coronary endothelium damage and cardiomyocyte necrosis but not apoptosis after ischemia and reperfusion: ex-vivo study in rat hearts. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 15, 225-232.
 74. Di Sario,A., Candelaresi,C., Omenetti,A., and Benedetti,A. **(2007)**. Vitamin E in chronic liver diseases and liver fibrosis. *Vitam. Horm.* 76, 551-573.
 75. Ding,G., Fu,M., Qin,Q., Lewis,W., Kim,H.W., Fukai,T., Bacanamwo,M., Chen,Y.E., Schneider,M.D., Mangelsdorf,D.J., Evans,R.M., and Yang,Q. **(2007)**. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc. Res.* 76, 269-279.
 76. Drimal,J., Zurova-Nedelcevoa,J., Knezl,V., Sotnikova,R., and Navarova,J. **(2006)**. Cardiovascular toxicity of the first line cancer chemotherapeutic agents: doxorubicin, cyclophosphamide, streptozotocin and bevacizumab. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 27 Suppl 2, 176-179.
 77. Duronio,V. **(2008)**. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J.* 415, 333-344.
 78. El Demerdash,E., Ali,A.A., Sayed-Ahmed,M.M., and Osman,A.M. **(2003)**. New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52, 411-416.
 79. El Demerdash,E., Salam,O.M., El Batran,S.A., Abdallah,H.M., and Shaffie,N.M. **(2008)**. Inhibition of the renin-angiotensin system attenuates the development of liver fibrosis and oxidative stress in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 35, 159-167.

80. El Eter,E., Al Tuwajjiri,A., Hagar,H., and Arafa,M. (2007). In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 1791-1799.
81. El Rayes,B.F., Ibrahim,D., Shields,A.F., LoRusso,P.M., Zalupski,M.M., and Philip,P.A. (2005). Phase I study of liposomal doxorubicin (Doxil) and cyclophosphamide in solid tumors. *Invest New Drugs* 23, 57-62.
82. Elsharkawy,A.M., Oakley,F., and Mann,D.A. (2005). The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis.* 10, 927-939.
83. Enomoto,M., Nagaya,N., Uematsu,M., Okumura,H., Nakagawa,E., Ono,F., Hosoda,H., Oya,H., Kojima,M., Kanmatsuse,K., and Kangawa,K. (2003). Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin. Sci. (Lond)* 105, 431-435.
84. Erdogan,O., Yildiz,S., Basaran,A., Demirbas,A., and Yesilkaya,A. (2001). Effect of intraportal verapamil infusion on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Pol. J. Pharmacol.* 53, 137-141.
85. Evans,P. and Halliwell,B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* 85 Suppl 2, S67-S74.
86. Fallowfield,J.A., Mizuno,M., Kendall,T.J., Constandinou,C.M., Benyon,R.C., Duffield,J.S., and Iredale,J.P. (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J. Immunol.* 178, 5288-5295.
87. Febbraio,M., Hajjar,D.P., and Silverstein,R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest* 108, 785-791.
88. Ferrari,R., Guardigli,G., Mele,D., Percoco,G.F., Ceconi,C., and Curello,S. (2004). Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr. Pharm. Des* 10, 1699-1711.
89. Ferrero,J.M., Weber,B., Geay,J.F., Lepille,D., Orfeuvre,H., Combe,M., Mayer,F., Leduc,B., Bourgeois,H., Paraiso,D., and Pujade-Lauraine,E. (2007). Second-line chemotherapy with pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin is highly effective in patients with advanced ovarian cancer in late relapse: a GINECO phase II trial. *Ann. Oncol.* 18, 263-268.
90. Fiallo,M.M., Drechsel,H., Garnier-Suillerot,A., Matzanke,B.F., and Kozlowski,H. (1999). Solution structure of iron(III)-anthracycline complexes. *J. Med. Chem.* 42, 2844-2851.
91. Fondevila,C., Busuttill,R.W., and Kupiec-Weglinski,J.W. (2003). Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp. Mol. Pathol.* 74, 86-93.
92. Frago,L.M., Paneda,C., Argente,J., and Chowen,J.A. (2005). 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.* 17, 701-710.
93. Frago,L.M., Paneda,C., Dickson,S.L., Hewson,A.K., Argente,J., and Chowen,J.A. (2002). 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* 143, 4113-4122.
94. Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893, 13-18.
 95. Friedenberg, M.A., Miller, L., Chung, C.Y., Fleszler, F., Banson, F.L., Thomas, R., Swartz, K.P., and Friedenberg, F.K. (2005). Simplified method of hepatic fibrosis quantification: design of a new morphometric analysis application. *Liver Int.* 25, 1156-1161.
 96. Friedman, S.L. (2007). Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis--is it all hype? *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 4, 236-237.
 97. Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J. Hepatol.* 38 Suppl 1, S38-S53.
 98. Gabele, E., Brenner, D.A., and Rippe, R.A. (2003). Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci.* 8, d69-d77.
 99. Gaddi, A., Cicero, A.F., and Pedro, E.J. (2004). Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxygenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 38, 201-212.
 100. Galaris, D., Barbouti, A., and Korantzopoulos, P. (2006). Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr. Pharm. Des* 12, 2875-2890.
 101. Ganem, G., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Combe, M., Misset, J.L., Vannetzel, J.M., Bachelot, T., De Ybarlucea, L.R., Lotz, V., Bendahmane, B., and Dieras, V. (2003). Phase II trial combining docetaxel and doxorubicin as neoadjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann. Oncol.* 14, 1623-1628.
 102. Geerts, A., Eliasson, C., Niki, T., Wielant, A., Vaeyens, F., and Pekny, M. (2001). Formation of normal desmin intermediate filaments in mouse hepatic stellate cells requires vimentin. *Hepatology* 33, 177-188.
 103. Ghe, C., Cassoni, P., Catapano, F., Marrocco, T., Deghenghi, R., Ghigo, E., Muccioli, G., and Papotti, M. (2002). The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. *Endocrinology* 143, 484-491.
 104. Ghigo, E., Arvat, E., Gianotti, L., Imbimbo, B.P., Lenaerts, V., Deghenghi, R., and Camanni, F. (1994). Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 78, 693-698.
 105. Ghigo, E., Arvat, E., Muccioli, G., and Camanni, F. (1997). Growth hormone-releasing peptides. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 445-460.
 106. Gines, P., Cardenas, A., Arroyo, V., and Rodes, J. (2004). Management of cirrhosis and ascites. *N. Engl. J. Med.* 350, 1646-1654.

107. Girn,H.R., Ahilathirunayagam,S., Mavor,A.I., and Homer-Vanniasinkam,S. (2007). Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc. Endovascular. Surg.* 41, 277-293.
108. Gnanapavan,S., Kola,B., Bustin,S.A., Morris,D.G., McGee,P., Fairclough,P., Bhattacharya,S., Carpenter,R., Grossman,A.B., and Korbonits,M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 2988.
109. Gnanapragasam,A., Yogeeta,S., Subhashini,R., Ebenezar,K.K., Sathish,V., and Devaki,T. (2007). Adriamycin induced myocardial failure in rats: protective role of *Centella asiatica*. *Mol. Cell Biochem.* 294, 55-63.
110. Gonzalez,F.J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat. Res.* 569, 101-110.
111. Granado,M., Martin,A.I., Lopez-Menduina,M., Lopez-Calderon,A., and Villanua,M.A. (2008). GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 294, E131-E141.
112. Gressner,A.M. and Weiskirchen,R. (2006). Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J. Cell Mol. Med.* 10, 76-99.
113. Gressner,A.M., Weiskirchen,R., Breitkopf,K., and Dooley,S. (2002). Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 7, d793-d807.
114. Guillaume,V., Magnan,E., Cataldi,M., Dutour,A., Sauze,N., Renard,M., Razafindraibe,H., Conte-Devolx,B., Deghenghi,R., Lenaerts,V., and . (1994). Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology* 135, 1073-1076.
115. Halliwell,B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147-1150.
116. Halliwell,B. and Gutteridge,J.M. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8, 89-193.
117. Hammel,P., Couvelard,A., O'Toole,D., Ratouis,A., Sauvanet,A., Flejou,J.F., Degott,C., Belghiti,J., Bernades,P., Valla,D., Ruszniewski,P., and Levy,P. (2001). Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N. Engl. J. Med.* 344, 418-423.
118. Hao,X., Bruce,C.J., Pislaru,C., and Greenleaf,J.F. (2002). Characterization of reperfused infarcted myocardium from high-frequency intracardiac ultrasound imaging using homodyned K distribution. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 49, 1530-1542.
119. Harada,N., Okajima,K., Kurihara,H., and Nakagata,N. (2008). Antithrombin prevents reperfusion-induced hepatic apoptosis by enhancing insulin-like growth factor-I production in mice. *Crit Care Med.* 36, 971-974.
120. Hartl,W.H., Wolf,H., Schneider,C.P., Fertmann,J., Kuchenhoff,H., and Jauch,K.W. (2006). [Significance of multiple organ failure for the prognosis of surgical intensive care patients]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 131, 2456-2460.

121. Hausenloy,D.J., Duchon,M.R., and Yellon,D.M. (2003). Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 60, 617-625.
122. Hayasaka,A. and Saisho,H. (1998). Serum markers as tools to monitor liver fibrosis. *Digestion* 59, 381-384.
123. Hayward,R. and Hydock,D.S. (2007). Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. *J. Am. Assoc. Lab Anim Sci.* 46, 20-32.
124. Hemmann,S., Graf,J., Roderfeld,M., and Roeb,E. (2007). Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J. Hepatol.* 46, 955-975.
125. Herrington,J. and Hille,B. (1994). Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* 135, 1100-1108.
126. Hicks,J.J., Montes-Cortes,D.H., Cruz-Dominguez,M.P., Medina-Santillan,R., and Olivares-Corichi,I.M. (2007). Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation. *Front Biosci.* 12, 2029-2037.
127. Hiramitsu,S., Miyagishima,K., Mori,K., and Kimura,H. (2007). [Heart failure due to dilated cardiomyopathy]. *Nippon Rinsho* 65 Suppl 5, 421-424.
128. Hoffman,J.W., Jr., Gilbert,T.B., Poston,R.S., and Silldorff,E.P. (2004). Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J. Extra. Corpor. Technol.* 36, 391-411.
129. Hogg,N., Darley-Usmar,V.M., Wilson,M.T., and Moncada,S. (1992). Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.* 281 (Pt 2), 419-424.
130. Hortobagyi,G.N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs* 54 Suppl 4, 1-7.
131. Howard,A.D., Feighner,S.D., Cully,D.F., Arena,J.P., Liberato,P.A., Rosenblum,C.I., Hamelin,M., Hreniuk,D.L., Palyha,O.C., Anderson,J., Paress,P.S., Diaz,C., Chou,M., Liu,K.K., McKee,K.K., Pong,S.S., Chaung,L.Y., Elbrecht,A., Dashkevich,M., Heavens,R., Rigby,M., Sirinathsinghji,D.J., Dean,D.C., Melillo,D.G., Patchett,A.A., Nargund,R., Griffin,P.R., DeMartino,J.A., Gupta,S.K., Schaeffer,J.M., Smith,R.G., and Van Der Ploeg,L.H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273, 974-977.
132. Hundal,R.S., Salh,B.S., Schrader,J.W., Gomez-Munoz,A., Duronio,V., and Steinbrecher,U.P. (2001). Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J. Lipid Res.* 42, 1483-1491.
133. Hwang,J., Kleinhenz,D.J., Lassegue,B., Griendling,K.K., Dikalov,S., and Hart,C.M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 288, C899-C905.

134. Ichihara,S., Yamada,Y., Kawai,Y., Osawa,T., Furuhashi,K., Duan,Z., and Ichihara,G. (2007). Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359, 27-33.
135. Ihn,H. (2002). Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14, 681-685.
136. Isgaard,J. (2004). Cardiovascular disease and risk factors: the role of growth hormone. *Horm. Res.* 62 Suppl 4, 31-38.
137. Issa,R., Zhou,X., Constandinou,C.M., Fallowfield,J., Millward-Sadler,H., Gaca,M.D., Sands,E., Suliman,I., Trim,N., Knorr,A., Arthur,M.J., Benyon,R.C., and Iredale,J.P. (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 126, 1795-1808.
138. Iwase,M., Kanazawa,H., Kato,Y., Nishizawa,T., Somura,F., Ishiki,R., Nagata,K., Hashimoto,K., Takagi,K., Izawa,H., and Yokota,M. (2004). Growth hormone-releasing peptide can improve left ventricular dysfunction and attenuate dilation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc. Res.* 61, 30-38.
139. Jaeschke,H. (2003). Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J. Invest Surg.* 16, 127-140.
140. Jensen,B.V., Skovsgaard,T., and Nielsen,S.L. (2002). Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. *Ann. Oncol.* 13, 699-709.
141. Jiang,H., Meng,F., Li,W., Tong,L., Qiao,H., and Sun,X. (2007). Splenectomy ameliorates acute multiple organ damage induced by liver warm ischemia reperfusion in rats. *Surgery* 141, 32-40.
142. Johansen,P.B., Hansen,K.T., Andersen,J.V., and Johansen,N.L. (1998). Pharmacokinetic evaluation of ipamorelin and other peptidyl growth hormone secretagogues with emphasis on nasal absorption. *Xenobiotica* 28, 1083-1092.
143. Johansson,I., Destefanis,S., Aberg,N.D., Aberg,M.A., Blomgren,K., Zhu,C., Ghe,C., Granata,R., Ghigo,E., Muccioli,G., Eriksson,P.S., and Isgaard,J. (2008). Proliferative and protective effects of growth hormone secretagogues on adult rat hippocampal progenitor cells. *Endocrinology* 149, 2191-2199.
144. Jung,J.Y. and Lee,S.M. (2005). The roles of Kupffer cells in hepatic dysfunction induced by ischemia/reperfusion in rats. *Arch. Pharm. Res.* 28, 1386-1391.
145. Kaminski,K.A., Bonda,T.A., Korecki,J., and Musial,W.J. (2002). Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int. J. Cardiol.* 86, 41-59.
146. Kawada,N. and Otagawa,K. (2007). Role of oxidative stress and Kupffer cells in hepatic fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22 Suppl 1, S85-S86.
147. Ke,Q. and Costa,M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 70, 1469-1480.

148. Keeley,E.C., Boura,J.A., and Grines,C.L. (2006). Comparison of primary and facilitated percutaneous coronary interventions for ST-elevation myocardial infarction: quantitative review of randomised trials. *Lancet* 367, 579-588.
149. Kershenobich,S.D. and Weissbrod,A.B. (2003). Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann. Hepatol.* 2, 159-163.
150. Kimura,F., Shimizu,H., Yoshidome,H., Ohtsuka,M., Kato,A., Yoshitomi,H., Nozawa,S., Furukawa,K., Mitsuhashi,N., Sawada,S., Takeuchi,D., Ambiru,S., and Miyazaki,M. (2006). Circulating cytokines, chemokines, and stress hormones are increased in patients with organ dysfunction following liver resection. *J. Surg. Res.* 133, 102-112.
151. Kojima,M., Hosoda,H., Date,Y., Nakazato,M., Matsuo,H., and Kangawa,K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
152. Kojima,M., Hosoda,H., Matsuo,H., and Kangawa,K. (2001). Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol. Metab* 12, 118-122.
153. Kojo,S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11, 1041-1064.
154. Koppenol,W.H. (2001). The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox. Rep.* 6, 229-234.
155. Krawisz,J.E., Sharon,P., and Stenson,W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.
156. Kregel,K.C. and Zhang,H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 292, R18-R36.
157. Ladilov,Y., Efe,O., Schafer,C., Rother,B., Kasseckert,S., Abdallah,Y., Meuter,K., Dieter,S.K., and Piper,H.M. (2003). Reoxygenation-induced rigor-type contracture. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35, 1481-1490.
158. Lakireddy,V., Bub,G., Baweja,P., Syed,A., Boutjdir,M., and El Sherif,N. (2006). The kinetics of spontaneous calcium oscillations and arrhythmogenesis in the in vivo heart during ischemia/reperfusion. *Heart Rhythm.* 3, 58-66.
159. Lebrecht,D., Kokkori,A., Ketelsen,U.P., Setzer,B., and Walker,U.A. (2005). Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J. Pathol.* 207, 436-444.
160. Lei,T., Buchfelder,M., Fahlbusch,R., and Adams,E.F. (1995). Growth hormone releasing peptide (GHRP-6) stimulates phosphatidylinositol (PI) turnover in human pituitary somatotroph cells. *J. Mol. Endocrinol.* 14, 135-138.
161. Lemasters,J.J., Bond,J.M., Chacon,E., Harper,I.S., Kaplan,S.H., Ohata,H., Trollinger,D.R., Herman,B., and Cascio,W.E. (1996). The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 76, 99-114.

162. Li,L., Qu,Y., Mao,M., Xiong,Y., and Mu,D. (2008). The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 1197, 152-158.
163. Li,T. and Singal,P.K. (2000). Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 102, 2105-2110.
164. Liu,D.L., Jeppsson,B., Hakansson,C.H., and Odselius,R. (1996). Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Arch. Surg.* 131, 442-447.
165. Liu,X., Hu,H., and Yin,J.Q. (2006). Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int.* 26, 8-22.
166. Liu,Y., Li,L., Yu,Z., Liu,Q., Li,Z., Wang,Y., and Zhang,Q. (2002). [Correlative study between portal vein pressure and portal hemodynamics in patients with portal hypertension]. *Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi.* 10, 135-137.
167. Llesuy,S.F. and Arnaiz,S.L. (1990). Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology* 63, 187-198.
168. Locatelli,V., Rossoni,G., Schweiger,F., Torsello,A., De,G.C., V, Bernareggi,M., Deghenghi,R., Muller,E.E., and Berti,F. (1999). Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 140, 4024-4031.
169. Lucchesi,P.A. (2004). Growth hormone-releasing peptides and the heart: secretagogues or cardioprotectors? *Cardiovasc. Res.* 61, 7-8.
170. Maccarinelli,G., Sibilìa,V., Torsello,A., Raimondo,F., Pitto,M., Giustina,A., Netti,C., and Cocchi,D. (2005). Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *J. Endocrinol.* 184, 249-256.
171. Maisch,B., Ristic,A.D., Hufnagel,G., Funck,R., Alter,P., Tontsch,D., and Pankuweit,S. (2002). Dilated cardiomyopathies as a cause of congestive heart failure. *Herz* 27, 113-134.
172. Maison,P. and Chanson,P. (2006). Less is more risky? Growth hormone and insulin-like growth factor 1 levels and cardiovascular risk. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab* 2, 650-651.
173. Makazan,Z., Saini,H.K., and Dhalla,N.S. (2007). Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 292, H1986-H1994.
174. Malhotra,V., Dorr,V.J., Lyss,A.P., Anderson,C.M., Westgate,S., Reynolds,M., Barrett,B., and Perry,M.C. (2004). Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy with doxorubicin and docetaxel in locally advanced breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 5, 377-384.
175. Mardini,H. and Record,C. (2005). Detection assessment and monitoring of hepatic fibrosis: biochemistry or biopsy? *Ann. Clin. Biochem.* 42, 441-447.
176. McCord,J.M. and Edeas,M.A. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed. Pharmacother.* 59, 139-142.

177. McKee,K.K., Tan,C.P., Palyha,O.C., Liu,J., Feighner,S.D., Hreniuk,D.L., Smith,R.G., Howard,A.D., and Van Der Ploeg,L.H. (1997). Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 46, 426-434.
178. Mehendale,H.M. and Limaye,P.B. (2005). Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 232-236.
179. Mendez-Sanchez,N., Villa,A.R., Zamora-Valdes,D., Morales-Espinosa,D., and Uribe,M. (2007). Worldwide mortality from cirrhosis. *Ann. Hepatol.* 6, 194-195.
180. Mericq,V., Cassorla,F., Salazar,T., Avila,A., Iniguez,G., Bowers,C.Y., and Merriam,G.R. (1998). Effects of eight months treatment with graded doses of a growth hormone (GH)-releasing peptide in GH-deficient children. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83, 2355-2360.
181. Meyer,K., Brown,M.F., Zibari,G., Panes,J., McMillan,R.W., McDonald,J.C., and Granger,D.N. (1998). ICAM-1 upregulation in distant tissues after hepatic ischemia/reperfusion: a clue to the mechanism of multiple organ failure. *J. Pediatr. Surg.* 33, 350-353.
182. Milei,J., Grana,D.R., Forcada,P., and Ambrosio,G. (2007). Mitochondrial oxidative and structural damage in ischemia-reperfusion in human myocardium. Current knowledge and future directions. *Front Biosci.* 12, 1124-1130.
183. Minotti,G., Menna,P., Salvatorelli,E., Cairo,G., and Gianni,L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185-229.
184. Mitani,M., Kaji,H., Abe,H., and Chihara,K. (1996). Growth hormone (GH)-releasing peptide and GH releasing hormone stimulate GH release from subpopulations of somatotrophs in rats. *J. Neuroendocrinol.* 8, 825-830.
185. Moncada,S. and Higgs,E.A. (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S193-S201.
186. Monti,E., Prosperi,E., Supino,R., and Bottiroli,G. (1995). Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer Res.* 15, 193-197.
187. Moon,C., Krawczyk,M., Ahn,D., Ahmet,I., Paik,D., Lakatta,E.G., and Talan,M.I. (2003). Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 11612-11617.
188. Moreira,R.K. (2007). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch. Pathol. Lab Med.* 131, 1728-1734.
189. Morin,D., Pires,F., Plin,C., and Tillement,J.P. (2004). Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2065-2073.
190. Mukherjee,S., Banerjee,S.K., Maulik,M., Dinda,A.K., Talwar,K.K., and Maulik,S.K. (2003). Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF-alpha expression. *BMC. Pharmacol.* 3, 16.

191. Munteanu,A., Taddei,M., Tamburini,I., Bergamini,E., Azzi,A., and Zingg,J.M. (2006). Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and alpha-tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Biol. Chem.* 281, 6489-6497.
192. Myers,C. (1998). The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin. Oncol.* 25, 10-14.
193. Mytilineou,C., Kramer,B.C., and Yabut,J.A. (2002). Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism. Relat Disord.* 8, 385-387.
194. Nagaya,N., Moriya,J., Yasumura,Y., Uematsu,M., Ono,F., Shimizu,W., Ueno,K., Kitakaze,M., Miyatake,K., and Kangawa,K. (2004). Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 110, 3674-3679.
195. Nagaya,N., Uematsu,M., Kojima,M., Ikeda,Y., Yoshihara,F., Shimizu,W., Hosoda,H., Hirota,Y., Ishida,H., Mori,H., and Kangawa,K. (2001). Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 104, 1430-1435.
196. Natarajan,S.K., Thomas,S., Ramamoorthy,P., Basivireddy,J., Pulimood,A.B., Ramachandran,A., and Balasubramanian,K.A. (2006). Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 947-957.
197. Neuhof,C., Fabiunke,V., Deibele,K., Speth,M., Moller,A., Lubisch,W., Fritz,H., Tillmanns,H., and Neuhof,H. (2004). Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol. Chem.* 385, 1077-1082.
198. Neuzil,J., Rayner,B.S., Lowe,H.C., and Witting,P.K. (2005). Oxidative stress in myocardial ischaemia reperfusion injury: a renewed focus on a long-standing area of heart research. *Redox. Rep.* 10, 187-197.
199. Ohkura,K., Lee,J.D., Shimizu,H., Nakano,A., Uzui,H., Horikoshi,M., Fujibayashi,Y., Yonekura,Y., and Ueda,T. (2003). Mitochondrial complex I activity is reduced in latent adriamycin-induced cardiomyopathy of rat. *Mol. Cell Biochem.* 248, 203-208.
200. Ong,H., McNicoll,N., Escher,E., Collu,R., Deghenghi,R., Locatelli,V., Ghigo,E., Muccioli,G., Boghen,M., and Nilsson,M. (1998). Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology* 139, 432-435.
201. Orn,S., Manhenke,C., Anand,I.S., Squire,I., Nagel,E., Edvardsen,T., and Dickstein,K. (2007). Effect of left ventricular scar size, location, and transmuralty on left ventricular remodeling with healed myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 99, 1109-1114.
202. Orozovic,V., Rafajlovski,S., Gligic,B., Mialilovic,Z., Obradovic,S., Ratkovic,N., Djenic,N., and Baskot,B. (2007). Diagnostic value of biohumoral markers of necrosis and inflammation in patients with right ventricular myocardial infarction. *Prilozi.* 28, 23-38.
203. Osterziel,K.J., Scheffold,T., Perrot,A., and Dietz,R. (2001). [Genetics of dilated cardiomyopathy]. *Z. Kardiol.* 90, 461-469.

-
204. Oyagi,S., Hirose,M., Kojima,M., Okuyama,M., Kawase,M., Nakamura,T., Ohgushi,H., and Yagi,K. **(2006)**. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J. Hepatol.* 44, 742-748.
 205. Paneda,C., Arroba,A.I., Frago,L.M., Holm,A.M., Romer,J., Argente,J., and Chowen,J.A. **(2003)**. Growth hormone-releasing peptide-6 inhibits cerebellar cell death in aged rats. *Neuroreport* 14, 1633-1635.
 206. Pang,J.J., Xu,R.K., Xu,X.B., Cao,J.M., Ni,C., Zhu,W.L., Asotra,K., Chen,M.C., and Chen,C. **(2004)**. Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis in vitro. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 286, H1063-H1069.
 207. Papotti,M., Ghe,C., Cassoni,P., Catapano,F., Deghenghi,R., Ghigo,E., and Muccioli,G. **(2000)**. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85, 3803-3807.
 208. Payne,A.S., James,W.D., and Weiss,R.B. **(2006)**. Dermatologic toxicity of chemotherapeutic agents. *Semin. Oncol.* 33, 86-97.
 209. Petit,T. **(2004)**. [Anthracycline-induced cardiotoxicity]. *Bull. Cancer* 91 Suppl 3, 159-165.
 210. Pettersson,I., Muccioli,G., Granata,R., Deghenghi,R., Ghigo,E., Ohlsson,C., and Isgaard,J. **(2002)**. Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *J. Endocrinol.* 175, 201-209.
 211. Pinelli,A., Trivulzio,S., Tomasoni,L., Brenna,S., Bonacina,E., and Accinni,R. **(2004)**. Isoproterenol-induced myocardial infarction in rabbits. Protection by propranolol or labetalol: a proposed non-invasive procedure. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23, 277-285.
 212. Piot,C., Croisille,P., Staat,P., Thibault,H., Rioufol,G., Mewton,N., Elbelghiti,R., Cung,T.T., Bonnefoy,E., Angoulvant,D., Macia,C., Raczka,F., Sportouch,C., Gahide,G., Finet,G., Andre-Fouet,X., Revel,D., Kirkorian,G., Monassier,J.P., Derumeaux,G., and Ovize,M. **(2008)**. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 359, 473-481.
 213. Poli,G. **(1993)**. Liver damage due to free radicals. *Br. Med. Bull.* 49, 604-620.
 214. Poli,G., Cottalasso,D., Pronzato,M.A., Chiarpotto,E., Biasi,F., Corongiu,F.P., Marinari,U.M., Nanni,G., and Dianzani,M.U. **(1990)**. Lipid peroxidation and covalent binding in the early functional impairment of liver Golgi apparatus by carbon tetrachloride. *Cell Biochem. Funct.* 8, 1-10.
 215. Pollack,C.V., Jr. and Braunwald,E. **(2008)**. 2007 update to the ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: implications for emergency department practice. *Ann. Emerg. Med.* 51, 591-606.
 216. Ravingerova,T., Slezak,J., Tribulova,N., Dzurba,A., Uhrík,B., and Ziegelhoffer,A. **(1999)**. Free oxygen radicals contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci.* 65, 1927-1930.
 217. Rodriguez-Sinovas,A., Abdallah,Y., Piper,H.M., and Garcia-Dorado,D. **(2007)**. Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail. Rev.* 12, 207-216.

-
218. Rosamond,W., Flegal,K., Furie,K., Go,A., Greenlund,K., Haase,N., Hailpern,S.M., Ho,M., Howard,V., Kissela,B., Kittner,S., Lloyd-Jones,D., McDermott,M., Meigs,J., Moy,C., Nichol,G., O'Donnell,C., Roger,V., Sorlie,P., Steinberger,J., Thom,T., Wilson,M., and Hong,Y. **(2008)**. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117, e25-146.
219. Saeki,K., Obi,I., Ogiku,N., Shigekawa,M., Imagawa,T., and Matsumoto,T. **(2002)**. Doxorubicin directly binds to the cardiac-type ryanodine receptor. *Life Sci.* 70, 2377-2389.
220. Saeki,T., Takashima,S., Ogita,M., Tabei,T., Adachi,I., Tamura,K., Takatsuka,Y., and Kanda,K. **(2006)**. Efficacy and toxicity of vinorelbine with doxorubicin/cyclophosphamide combination chemotherapy in a phase I-II study for advanced or recurrent breast cancer patients. *Breast Cancer* 13, 159-165.
221. Saile,B. and Ramadori,G. **(2007)**. Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types. *Z. Gastroenterol.* 45, 77-86.
222. Sanz,S., Pucilowska,J.B., Liu,S., Rodriguez-Ortigosa,C.M., Lund,P.K., Brenner,D.A., Fuller,C.R., Simmons,J.G., Pardo,A., Martinez-Chantar,M.L., Fagin,J.A., and Prieto,J. **(2005)**. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut* 54, 134-141.
223. Schrader,M. and Fahimi,H.D. **(2006)**. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1755-1766.
224. Schultheiss,H.P., Noutsias,M., Kuhl,U., Lassner,D., Gross,U., Poller,W., and Pauschinger,M. **(2005)**. [Cardiomyopathies. I: classification of cardiomyopathies--dilated cardiomyopathy]. *Internist (Berl)* 46, 1245-1256.
225. Schuppan,D. and Afdhal,N.H. **(2008)**. Liver cirrhosis. *Lancet* 371, 838-851.
226. Schuster,M.J. **(2003)**. [Complications of liver cirrhosis: portal hypertension, gastroesophageal varices and ascites]. *Praxis. (Bern. 1994.)* 92, 1427-1434.
227. Schwenke,D.O., Tokudome,T., Kishimoto,I., Horio,T., Shirai,M., Cragg,P.A., and Kangawa,K. **(2008)**. Early ghrelin treatment following myocardial infarction prevents an increase in cardiac sympathetic tone and reduces mortality. *Endocrinology*.
228. Sen,P., Mukherjee,S., Bhaumik,G., Das,P., Ganguly,S., Choudhury,N., and Raha,S. **(2003)**. Enhancement of catalase activity by repetitive low-grade H₂O₂ exposures protects fibroblasts from subsequent stress-induced apoptosis. *Mutat. Res.* 529, 87-94.
229. Shen,X.D., Ke,B., Zhai,Y., Gao,F., Anselmo,D., Lassman,C.R., Busuttill,R.W., and Kupiec-Weglinski,J.W. **(2003a)**. Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology* 37, 296-303.
230. Shen,Y.T., Lynch,J.J., Hargreaves,R.J., and Gould,R.J. **(2003b)**. A growth hormone secretagogue prevents ischemic-induced mortality independently of the growth hormone pathway in dogs with chronic dilated cardiomyopathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 815-820.

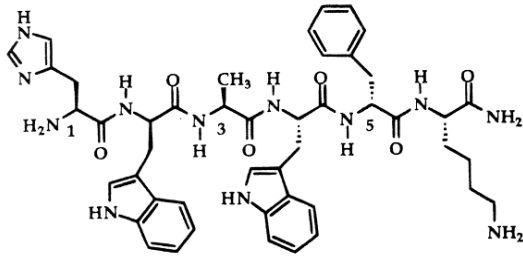
-
231. Siegmund,S.V. and Brenner,D.A. (2005). Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29, 102S-109S.
232. Singh,U., Devaraj,S., and Jialal,I. (2005). Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 151-174.
233. Solaini,G. and Harris,D.A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem. J.* 390, 377-394.
234. Spapen,H. (2008). Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anat. Rec. (Hoboken.)* 291, 714-720.
235. Spurr,A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43.
236. Stacey,D.W. (2003). Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 158-163.
237. Tacke,F., Brabant,G., Kruck,E., Horn,R., Schoffski,P., Hecker,H., Manns,M.P., and Trautwein,C. (2003). Ghrelin in chronic liver disease. *J. Hepatol.* 38, 447-454.
238. Takemura,G. and Fujiwara,H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49, 330-352.
239. Tannenbaum,G.S. and Bowers,C.Y. (2001). Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. *Endocrine.* 14, 21-27.
240. Teoh,N.C. and Farrell,G.C. (2003). Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 891-902.
241. Thielemans,L., Peeters,P.J., Jonckheere,H., Luyten,W., de Hoogt,R., Coulie,B., and Aerssens,J. (2007). The hepatocarcinoma cell line HepG2 does not express a GHS-R1a-type ghrelin receptor. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 27, 309-322.
242. Thomadaki,H. and Scorilas,A. (2006). BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 43, 1-67.
243. Thomas,S.R., Chen,K., and Keaney,J.F., Jr. (2003). Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid. Redox. Signal.* 5, 181-194.
244. Tivesten,A., Bollano,E., Caidahl,K., Kujacic,V., Sun,X.Y., Hedner,T., Hjalmarson,A., Bengtsson,B.A., and Isgaard,J. (2000). The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 141, 60-66.
245. Tivesten,A., Caidahl,K., Kujacic,V., Sun,X.Y., Hedner,T., Bengtsson,B.A., and Isgaard,J. (2001). Similar cardiovascular effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I in rats after experimental myocardial infarction. *Growth Horm. IGF. Res.* 11, 187-195.
246. Torsello,A., Bresciani,E., Rossoni,G., Avallone,R., Tulipano,G., Cocchi,D., Bulgarelli,I., Deghenghi,R., Berti,F., and Locatelli,V. (2003). Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 144, 1787-1792.

-
247. Towbin,J.A. and Bowles,N.E. **(2006)**. Dilated cardiomyopathy: a tale of cytoskeletal proteins and beyond. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17, 919-926.
248. Vetterlein,F., Schrader,C., Volkmann,R., Neckel,M., Ochs,M., Schmidt,G., and Hellige,G. **(2003)**. Extent of damage in ischemic, nonreperfused, and reperfused myocardium of anesthetized rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H755-H765.
249. Vianna,H.R., Cortes,S.F., Ferreira,A.J., Capettini,L.S., Schmitt,M., Almeida,A.P., Massensini,A.R., and Lemos,V.S. **(2006)**. Antiarrhythmic and antioxidant effect of the flavonoid dioclein in a model of cardiac ischemia/reperfusion. *Planta Med.* 72, 300-303.
250. Villa,L.M., Salas,E., Darley-Usmar,V.M., Radomski,M.W., and Moncada,S. **(1994)**. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12383-12387.
251. Vinten-Johansen,J. **(2004)**. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 61, 481-497.
252. Vivaldi,M.T., Kloner,R.A., and Schoen,F.J. **(1985)**. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.* 121, 522-530.
253. Vogt,W. **(2005)**. [Value of ultrasound and doppler sonography in chronic hepatitis and liver cirrhosis]. *Praxis. (Bern. 1994.)* 94, 639-643.
254. Wallace,J.D., Abbott-Johnson,W.J., Crawford,D.H., Barnard,R., Potter,J.M., and Cuneo,R.C. **(2002)**. GH treatment in adults with chronic liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 2751-2759.
255. Wang,G.Y., Wang,Y.M., Zhang,L.N., Li,Q., Yue,H., Song,C.M., Feng,J.K., and Wang,N. **(2007)**. [Effect of resveratrol on heart function of rats with adriamycin-induced heart failure]. *Zhongguo Zhong. Yao Za Zhi.* 32, 1563-1565.
256. Weekers,F., Van Herck,E., Isgaard,J., and Van den,B.G. **(2000)**. Pretreatment with growth hormone-releasing peptide-2 directly protects against the diastolic dysfunction of myocardial stunning in an isolated, blood-perfused rabbit heart model. *Endocrinology* 141, 3993-3999.
257. Weinbroum,A.A., Hochhauser,E., Rudick,V., Kluger,Y., Karchevsky,E., Graf,E., and Vidne,B.A. **(1999)**. Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species? *J. Trauma* 47, 691-698.
258. White,F.C., Roth,D.M., and Bloor,C.M. **(1986)**. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci.* 36, 351-356.
259. White,H.D. and Chew,D.P. **(2008)**. Acute myocardial infarction. *Lancet* 372, 570-584.
260. Whiteman,M., Rose,P., and Halliwell,B. **(2003)**. Inhibition of hypochlorous acid-induced oxidative reactions by nitrite: is nitrite an antioxidant? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 1217-1224.
261. Witko-Sarsat,V., Gausson,V., Nguyen,A.T., Touam,M., Druke,T., Santangelo,F., and Descamps-Latscha,B. **(2003)**. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative

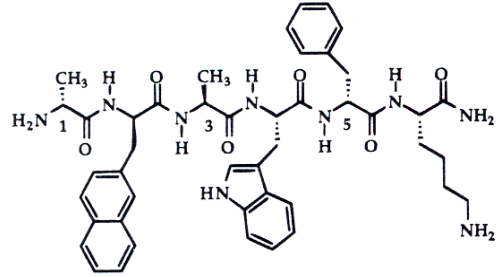
- metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int.* 64, 82-91.
262. Wu,D., Clarke,I.J., and Chen,C. (1997). The role of protein kinase C in GH secretion induced by GH-releasing factor and GH-releasing peptides in cultured ovine somatotrophs. *J. Endocrinol.* 154, 219-230.
263. Wu,H.H., Tao,L.C., and Cramer,H.M. (1996). Vimentin-positive spider-shaped Kupffer cells. A new clue to cytologic diagnosis of primary and metastatic hepatocellular carcinoma by fine-needle aspiration biopsy. *Am. J. Clin. Pathol.* 106, 517-521.
264. Wutzen,J., Lewicki,Z., and Rozycka,Z. (1986). Adriamycin effect on histological, histochemical and electron microscopy changes in rat myocardium. *Mater. Med. Pol.* 18, 191-197.
265. Xu,X., Pang,J., Yin,H., Li,M., Hao,W., Chen,C., and Cao,J.M. (2007). Hexarelin suppresses cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 293, H2952-H2958.
266. Xu,X., Sutak,R., and Richardson,D.R. (2008). Iron chelation by clinically relevant anthracyclines: alteration in expression of iron-regulated genes and atypical changes in intracellular iron distribution and trafficking. *Mol. Pharmacol.* 73, 833-844.
267. Xu,X.B., Cao,J.M., Pang,J.J., Xu,R.K., Ni,C., Zhu,W.L., Asotra,K., Chen,M.C., and Chen,C. (2003). The positive inotropic and calcium-mobilizing effects of growth hormone-releasing peptides on rat heart. *Endocrinology* 144, 5050-5057.
268. Xu,X.B., Pang,J.J., Cao,J.M., Ni,C., Xu,R.K., Peng,X.Z., Yu,X.X., Guo,S., Chen,M.C., and Chen,C. (2005). GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 289, H1643-H1651.
269. Yang,J., Gallagher,S.F., Haines,K., Epling-Burnette,P.K., Bai,F., Gower,W.R., Jr., Mastorides,S., Norman,J.G., and Murr,M.M. (2004a). Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J. Gastrointest. Surg.* 8, 166-174.
270. Yang,J.C., Wang,Z.W., Li,C.L., Lin,J.H., Liu,X.G., and Ji,Q.X. (2004b). Multiple organ injury at early stage of intestinal and hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Di Yi. Jun. Yi. Da. Xue. Xue. Bao.* 24, 198-200, 203.
271. Yassin,M.M., Harkin,D.W., Barros D'Sa,A.A., Halliday,M.I., and Rowlands,B.J. (2002). Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J. Surg.* 26, 115-121.
272. Yaylak,F., Canbaz,H., Caglikulekci,M., Dirlik,M., Tamer,L., Ogetman,Z., Polat,Y., Kanik,A., and Aydin,S. (2007). Liver Tissue Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression and Lipid Peroxidation in Experimental Hepatic Ischemia Reperfusion Injury Stimulated With Lipopolysaccharide: The Role of Aminoguanidine. *J. Surg. Res.*
273. Yellon,D.M. and Hausenloy,D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357, 1121-1135.

274. Yu,S., Matsusue,K., Kashireddy,P., Cao,W.Q., Yeldandi,V., Yeldandi,A.V., Rao,M.S., Gonzalez,F.J., and Reddy,J.K. **(2003)**. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 (PPARgamma1) overexpression. *J. Biol. Chem.* 278, 498-505.
275. Zhang,F., Tong,L., Qiao,H., Dong,X., Qiao,G., Jiang,H., and Sun,X. **(2008)**. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J. Surg. Res.* 149, 101-109.
276. Zhao,J., Yang,Y., you,S., Cui,C., and Gao,R. **(2007)**. Carvedilol preserves endothelial junctions and reduces myocardial no-reflow after acute myocardial infarction and reperfusion. *Int. J. Cardiol.* 115, 334-341.
277. Zhou,S., Palmeira,C.M., and Wallace,K.B. **(2001)**. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol. Lett.* 121, 151-157.
278. Zhu,Y.Q. and Zhang,P.Y. **(2004)**. [Therapeutic strategies for portal hypertension of liver cirrhosis with esophageal and gastric varicose]. *Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi.* 12, 507-509.
279. Zorov,D.B., Juhaszova,M., and Sollott,S.J. **(2006)**. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 509-517.

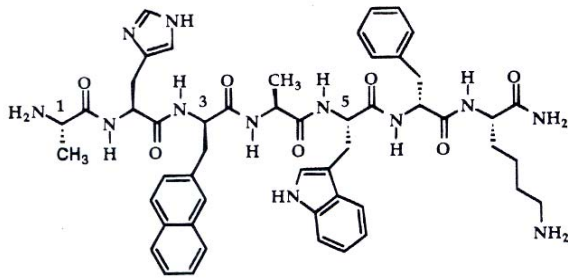
Anexo 1. Estructura de los secretagogos de la Hormona de Crecimiento.



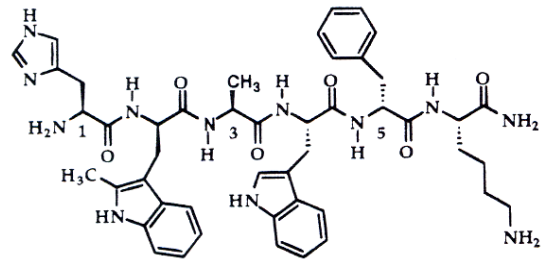
GHRP6



GHRP2



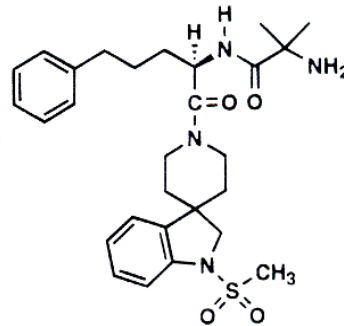
GHRP1



hexarelina



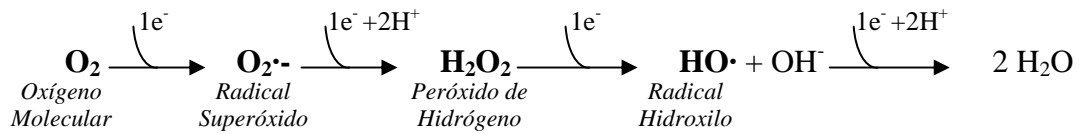
MK-0677



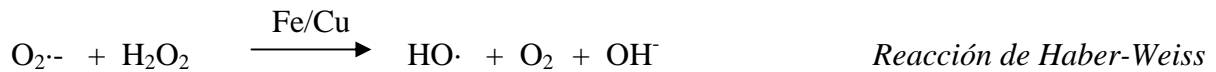
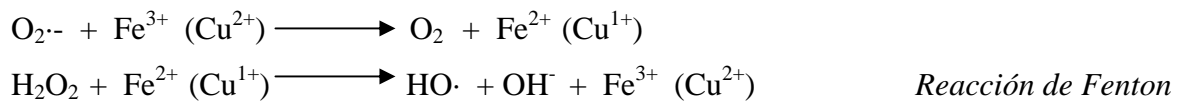
L-163,255

Anexo 2. Procesos generadores de Especies Reactivas del Oxígeno.

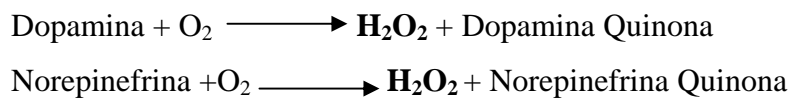
A. Reducción del O₂ molecular hasta H₂O durante el transporte electrónico mitocondrial.



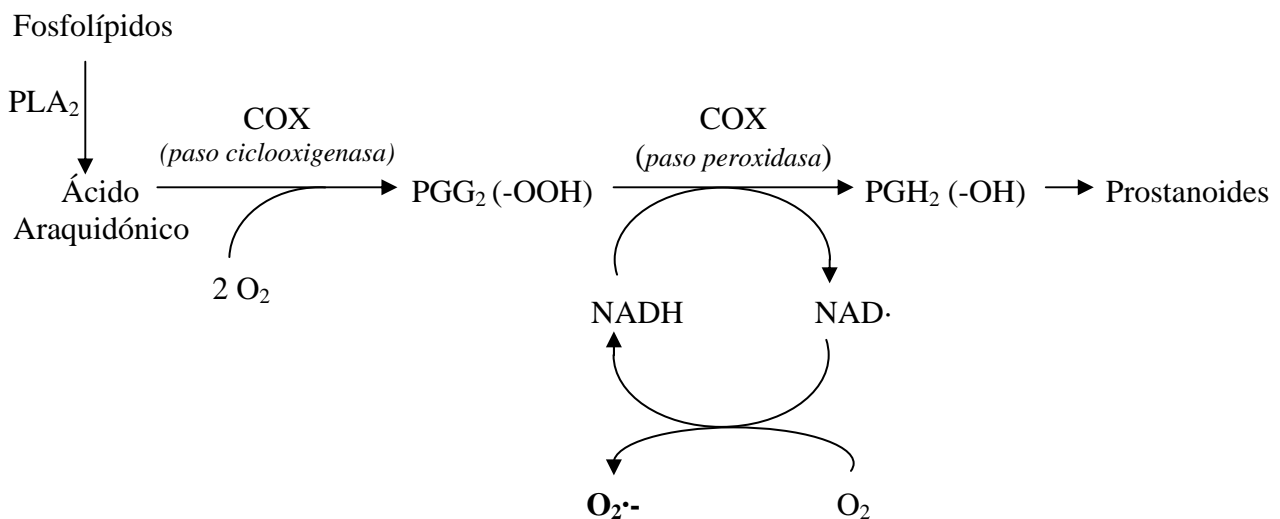
B. Reacciones catalizadas por metales. Reacción de Fenton y de Haber-Weiss.



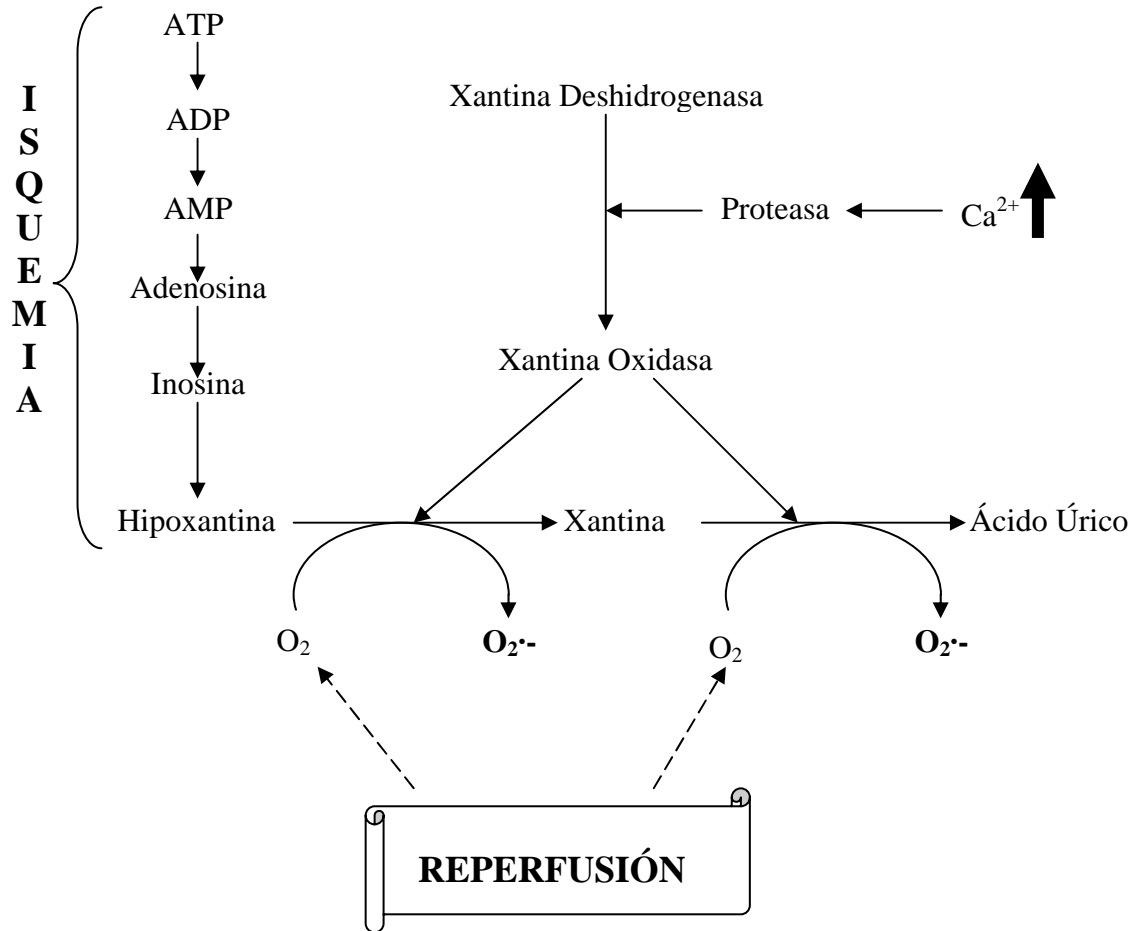
C. Autooxidación de catecolaminas (Proceso no enzimático).



D. Metabolismo del ácido araquidónico como fuente de Especies Reactivas del Oxígeno.

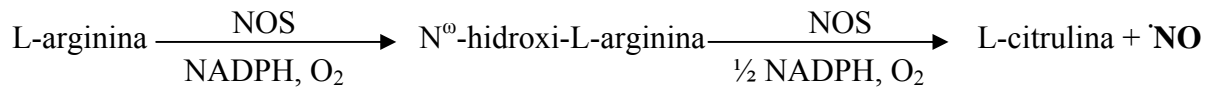


Anexo 3. Producción de Especies Reactivas del Oxígeno por la enzima Xantina Oxidasa durante la Isquemia/Reperusión.

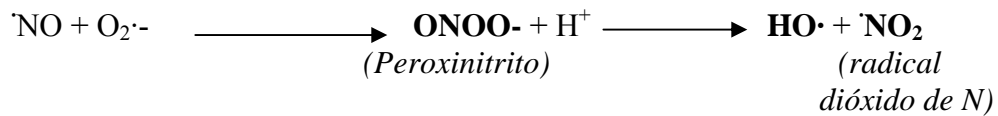


Anexo 4. Procesos generadores de Especies Reactivas del Nitrógeno.

A. Síntesis del Óxido Nítrico, reacción catalizada por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS).

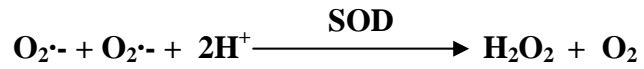


B. Reacción de formación y descomposición del peroxinitrito (proceso no enzimático).



Anexo 5. Reacciones catalizadas por los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante.

A. Reacción de dismutación del radical superóxido catalizada por la enzima SOD:

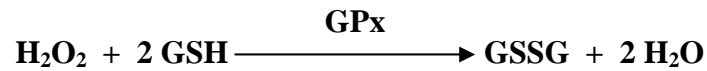


B. Reacción de reducción del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima Catalasa:



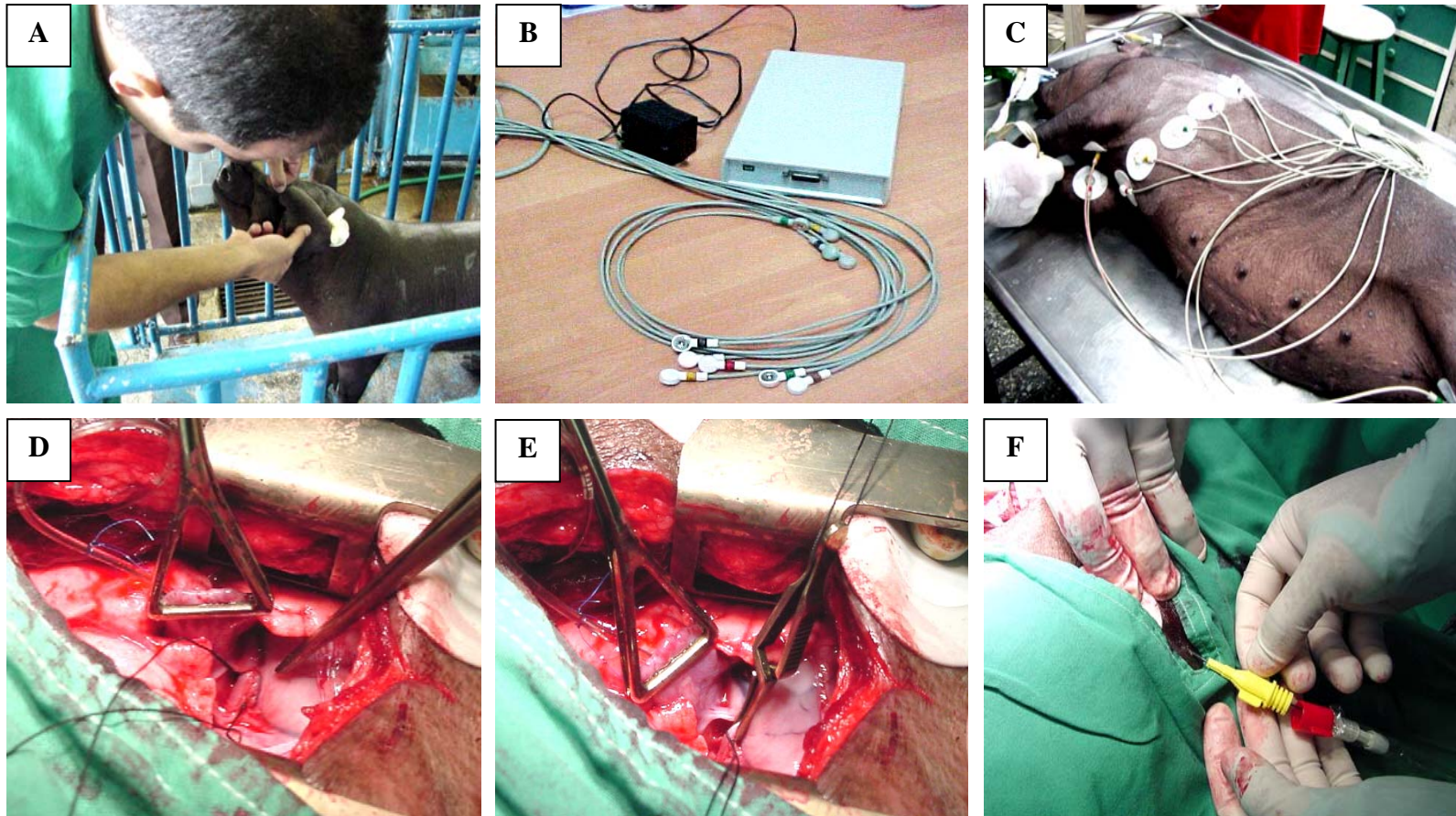
C. Reacción de reducción del peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima Glutatión

Peroxidasa (GPx) y ciclo del glutatión:



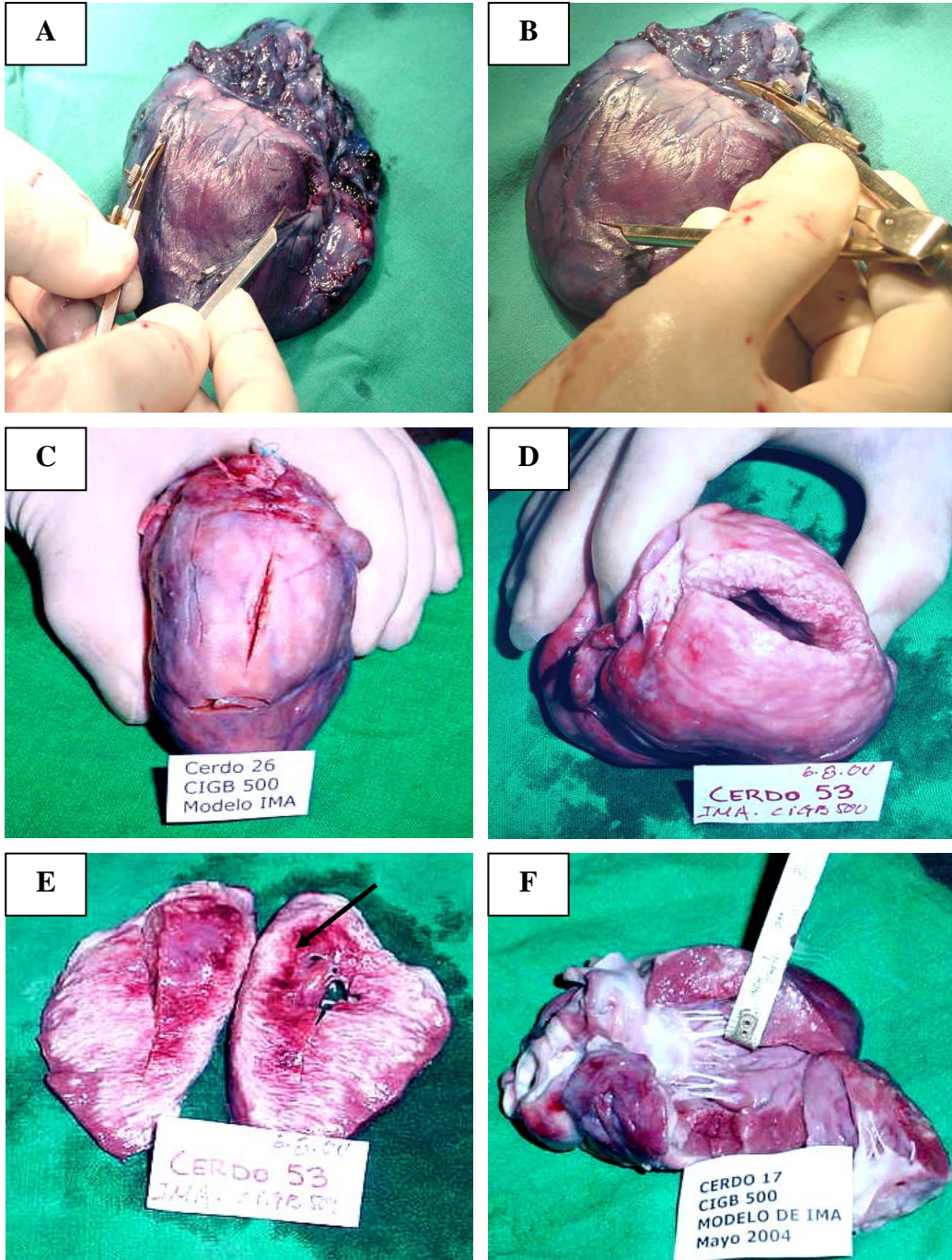
Anexo 6. Secuencias de los oligonucleótidos sintetizados y condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, empleadas para evaluar la expresión transcripcional de los genes estudiados.

Gen	Secuencias de Oligonucleótidos	Especie	# GenBank	Temp. (°C) del PCR	Longitud del producto de PCR
IGF1	5'-CTG TGG GGC TGA GCT GGT GGA CG 3'-AAG GAT CCT GCC AGT GGC ATG TC	Cerdo	M31175	68/94	353 pb
β -actina	5'-GGA GAT CGT GCG GGA CAT CAA GG 3'-GGC CGG ACT CGT CGT ACT CCT GC	Cerdo	AY550069	68/94	482 pb
β -actina	5'-CCA TGT ACG TAG CCA TCC AGG 3'-GAC AGT GAG GCC AGG ATA GAG C	Rata	BC063166	59/72/94	660 pb
IGF1	5'-CCG GAC CAG AGA CCC TTT 3'-AAA TGG TAT TGA ACT CAT TAT T	Rata	M17714	52/72/94	436 pb
Hif 1 α	5'-GCC AGA TCA CAG CAC ATT CAC 3'-AGC GAC AAA GTG CAT AAA ACC	Rata	NM 010431	50/72/94	750 pb
PI3K	5'-TTA GTT GTC CCC ACA CCC ATC 3'-GAG ATC ATC TAT CTG GTC CGT GC	Rata	5448U21	54/72/94	420 pb
PKB	5'-CGA CTA TGG CCG TGC AGT GGA 3'-GTT CCT CCC CAG CAC ATC CGA	Rata	1014U21	68/94	585 pb
Bax	5'- TGA TTG CTG ACG TGG ACA CGG AC 3'- TGA GCG AGG CGG TGA GGA CTC	Rata	236U23	68/94	321 pb
Bcl2	5'- GCT ACC GTC GCG ACT TTG CAG AG 3'- CAC TTG TGG CCC AGG TAT GCA CC	Rata	545U23	68/94	400 pb
TGF- β	5'-TGC CAG AAC CCC CAT TGC TG 3'-TCC ACC TTG GGC TTG CGA CC	Rata	NM021578	70/94	700 pb
CTGF	5'-AGA GCT GGG TGT GTG TCC TCC 3'-GCA GCA AAC ACT TCC TCG TGG	Rata	NM022266	70/94	547 pb
SODMn	5'-GGA TGG AGT GGT AGA GCC TTT 3'-TCT ACA CCC AAA TGC TGC ACA GG	Rata	NM017051	70/94	557 pb
MMP-13	5'-AAA GGG GAT AAC AGC CAC TAC AAG G 3'- GAG GGA TTA ACA AAC ATG GTG GAG C	Rata	M60616	55/72/94	470 pb



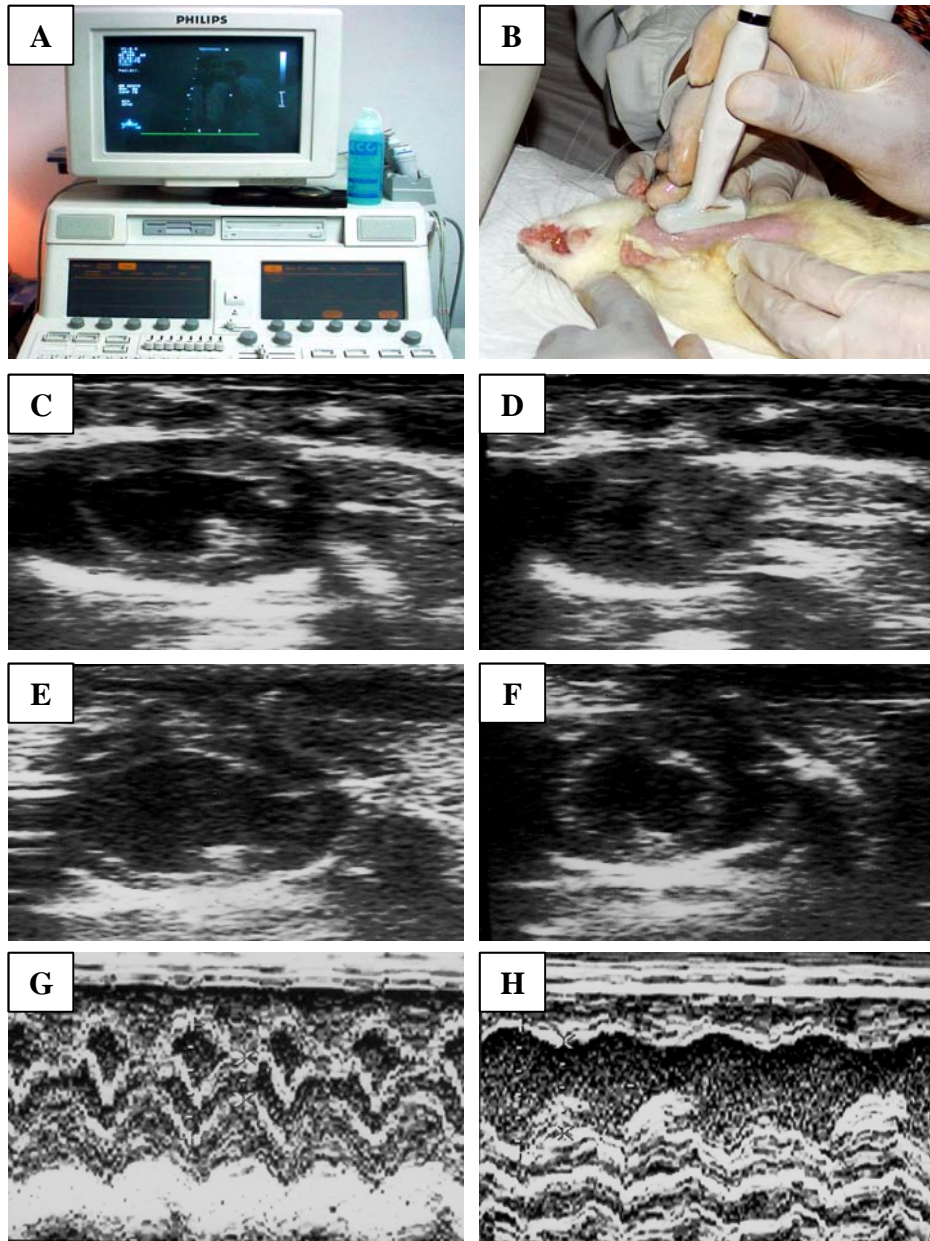
Anexo 7. Imágenes del procedimiento quirúrgico para establecer el modelo porcino de IMA.

(A) Se muestra el momento de canalización de una de las venas marginales de la oreja del cerdo, para administrarle la anestesia. (B) En la foto se muestra el equipo CYS-SG empleado para obtener los registros de ECG en los cerdos. (C) Se aprecia al cerdo entubado, que recibe la instilación de la mezcla de anestésicos y que exhibe los electrodos en posición apropiada para realizar el registro de ECG. (D) En la foto se aprecia el momento de suspensión por el hilo de seda 3-0 de la arteria circunfleja izquierda. (E) Momento de la colocación del clamp en la arteria circunfleja izquierda. (F) Parte externa del catéter transcutáneo Cavafix insertado para aplicar los tratamientos.



Anexo 8. Imágenes ilustrativas del procesamiento macroscópico de los IMA.

(A, B) Procedimiento empleado para obtener las dimensiones (ancho y largo) del IMA. (C, D) Se muestra la disección del área infartada. (E) Se muestran las secciones preparadas para ser incubadas con NBT. Se puede apreciar también una extensa zona de hemorragia, indicada por la flecha. (F) Procedimiento empleado para medir la muralidad del IMA.



Anexo 9. Imágenes de la evaluación por ECO realizada en el modelo de MCD. (A) Equipo de realización de ECO empleado, modelo Sonos 5500. (B) Realización de un ECO a una rata anestesiada con el transductor lineal de 11-15 MHz. Vistas por ECO del miocardio de una rata sana, en diástole (C) y en sístole (D). Vistas por ECO del miocardio de una rata con MCD, en diástole (E) y en sístole (F). Vistas ecocardiográficas en modo M de una rata sana (G) y con MCD (H).

Anexo 10. Descripción de las evaluaciones histológicas realizadas en el modelo de MCD inducido por la administración de DX en ratas.

Órgano evaluado	Parámetro evaluado	Descripción del método de evaluación	Expresión del resultado
Miocardio	Evaluación semicuantitativa de la afectación estructural de las paredes del VI.	<p>Escala empleada: 0-Histología normal del miocardio, 1-Daño leve, 2-Daño evidente, 3-Daño severo de las paredes del VI.</p>	Promedio de los valores de la escala para cada grupo experimental.
Miocardio	% de miofibrillas dañadas: Presencia de material basofílico granular, ondulación, tumefacción o fragmentación de las fibras.	Se estudiaron 10 campos microscópicos de fibras longitudinales (20X), por animal, escogidos al azar. Se determinó el % de fibras dañadas del total de fibras evaluadas, en cada campo.	Promedio del resultado obtenido en los 10 campos examinados por animal.
Pulmones	% de bronquios con necrosis de la mucosa epitelial.	Se estudiaron 10 campos microscópicos (10X), por animal, escogidos al azar. Se determinó el % de bronquios dañados del total, en cada campo.	Promedio del resultado obtenido en los 10 campos examinados por animal.
Riñones	% de túbulos con daños irreversibles en las células epiteliales.	Se estudiaron 10 campos microscópicos (20X), por animal, escogidos al azar. Se determinó el % de túbulos dañados irreversiblemente del total, en cada campo.	Promedio del resultado obtenido en los 10 campos examinados por animal.
Hígado	Congestión Pasiva Hepática	<p>Escala empleada: 0-No congestión, 1- Congestión evidente, 2-Intensa congestión con marcada distorsión sinusoidal.</p>	Promedio de los valores de la escala para cada grupo experimental.

**Anexo 11. Escalas histológicas empleadas en el modelo de I/R hepática y DMO
para la evaluación del daño en los diferentes órganos.**

A. Escala de Suzuki, empleada para la evaluación del daño hepático:

- 0 - Parénquima hepático normal.
- 1 - Presencia de balonamiento citoplasmático y leve distensión sinusoidal, no presencia de focos de necrosis de los hepatocitos.
- 2 - Moderada distensión sinusoidal, no presencia de focos de necrosis.
- 3 - Severa congestión sinusoidal con aislados focos de necrosis.
- 4 - Severa congestión sinusoidal y una extensión de la necrosis hepatocitaria superior al 60% del área examinada.

B. Escala de Chiu, empleada para la evaluación del daño en la mucosa intestinal:

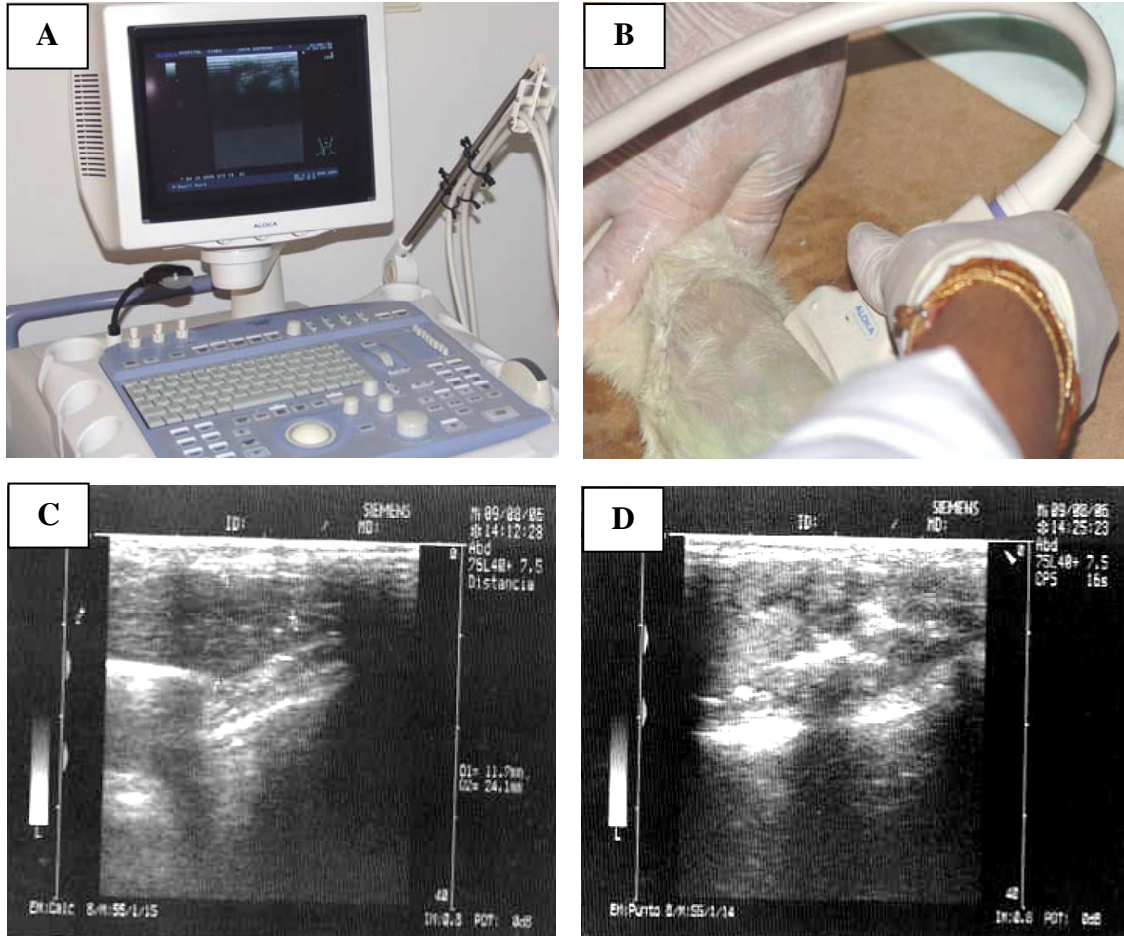
- 0 - Mucosa intestinal normal.
- 1 - Implantación de espacio sub-epitelial en el ápice de la vellosidad.
- 2 - Extensión del espacio sub-epitelial con un moderado levantamiento del epitelio de su base en la lámina propia.
- 3 - Levantamiento epitelial extenso con denudación del ápice de la vellosidad.
- 4 - Denudación de vellosidades con exposición de lámina propia y capilares dilatados.
- 5 - Desintegración de la lámina propia, presencia de hemorragia y ulceración.

C. Escala empleada para evaluar el daño en el epitelio tubular de los riñones:

- 0 - Histología renal normal.
- 1 - Daño renal moderado, cambios mayoritariamente reversibles (cambios citoplasmáticos hidrópicos).
- 2 - Cambios severos correspondientes a la fragmentación nuclear y el desprendimiento de la membrana basal del túbulo.

D. Escala empleada para evaluar el daño pulmonar:

- 0 - Histología pulmonar normal.
- 1 - Moderado engrosamiento septal, moderada hiper celularidad y reclutamiento neutrofílico, sin marcada reducción del espacio luminal alveolar.
- 2 - Severo engrosamiento septal, severa hiper celularidad, marcado reclutamiento neutrofílico, con una severa reducción del espacio alveolar.



Anexo 12. Evaluación del hígado por ultrasonido realizada en el estudio de cirrosis.

(A) Se muestra el equipo de ultrasonido empleado, modelo ALOKA. (B) Realización de un ultrasonido a una rata anestesiada, empleando el transductor de 11 MHz. (C) Vista por ultrasonido de un hígado de una rata sana. (D) Vista por ultrasonido de un hígado cirrótico; nótese el incremento del tamaño del hígado, de la ecogenicidad, la textura heterogénea así como la presencia de nódulos en el parénquima.

Anexo 13. Escalas empleadas para semicuantificar los resultados de los ultrasonidos realizados en el modelo de cirrosis inducida por CCL₄.

A. Evaluación semicuantitativa de la presencia de ascitis detectada por ultrasonido:

0-No ascitis.

1-Pequeño volumen de ascitis, visible solamente mediante ultrasonido.

2-Gran volumen de ascitis, evidente clínicamente por la distensión abdominal en las ratas.

B. Evaluación semicuantitativa de la nodularidad del parénquima hepático:

0-No presencia de nódulos en el parénquima hepático.

1-Uno ó dos nódulos en el parénquima hepático.

2-Animales con hígado multinodular, pero de nódulos pequeños.

3-Animales con hígado multinodular, con nódulos de gran talla.

C. Evaluación semicuantitativa de la ecogenicidad del parénquima hepático:

0-No aumento de la ecogenicidad.

1-Discreto aumento de la ecogenicidad del hígado.

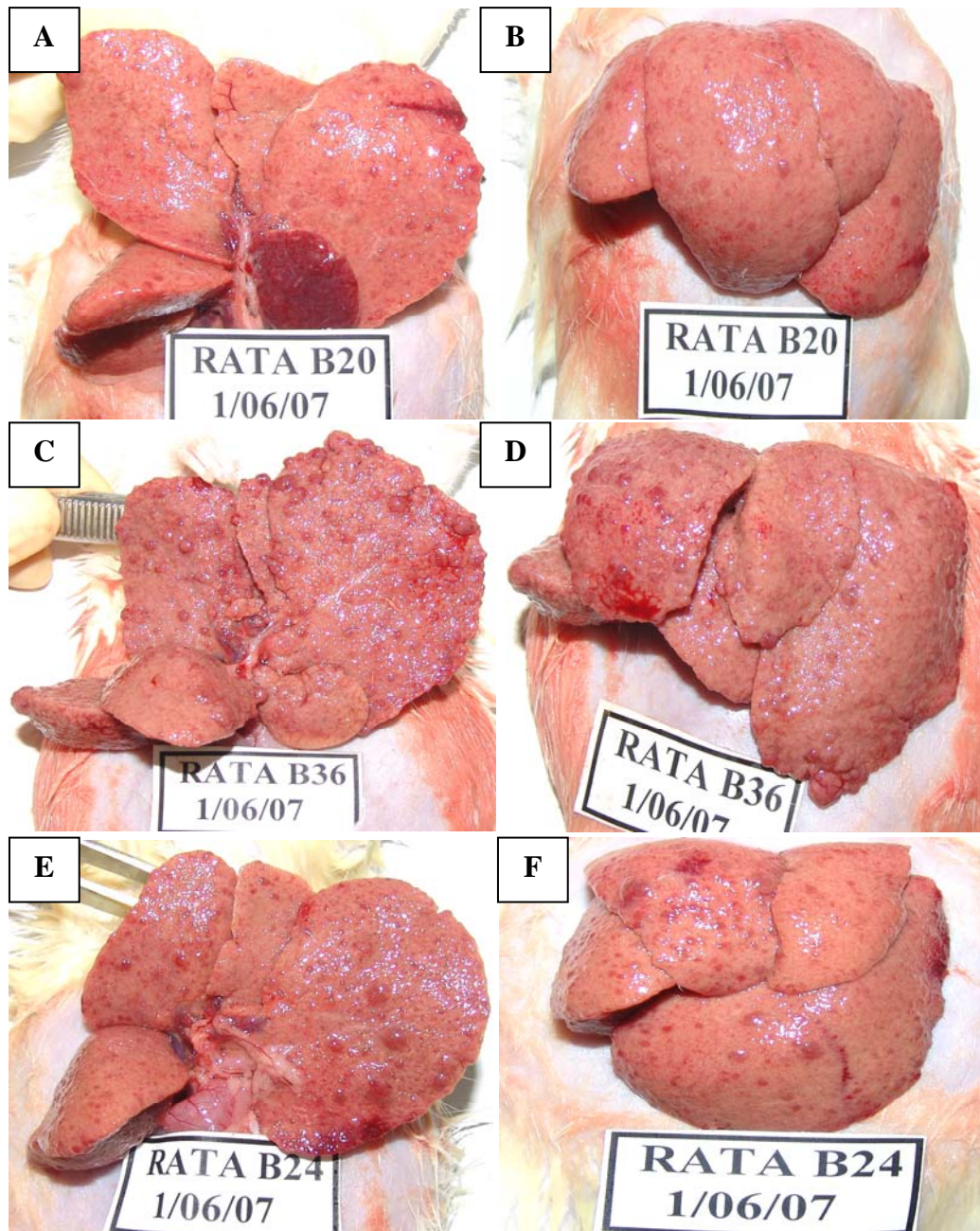
2-Marcado aumento de la ecogenicidad del parénquima hepático.

D. Evaluación semicuantitativa de la textura del parénquima hepático:

0-Parénquima de textura homogénea.

1-Parénquima de textura heterogénea, de granulado fino.

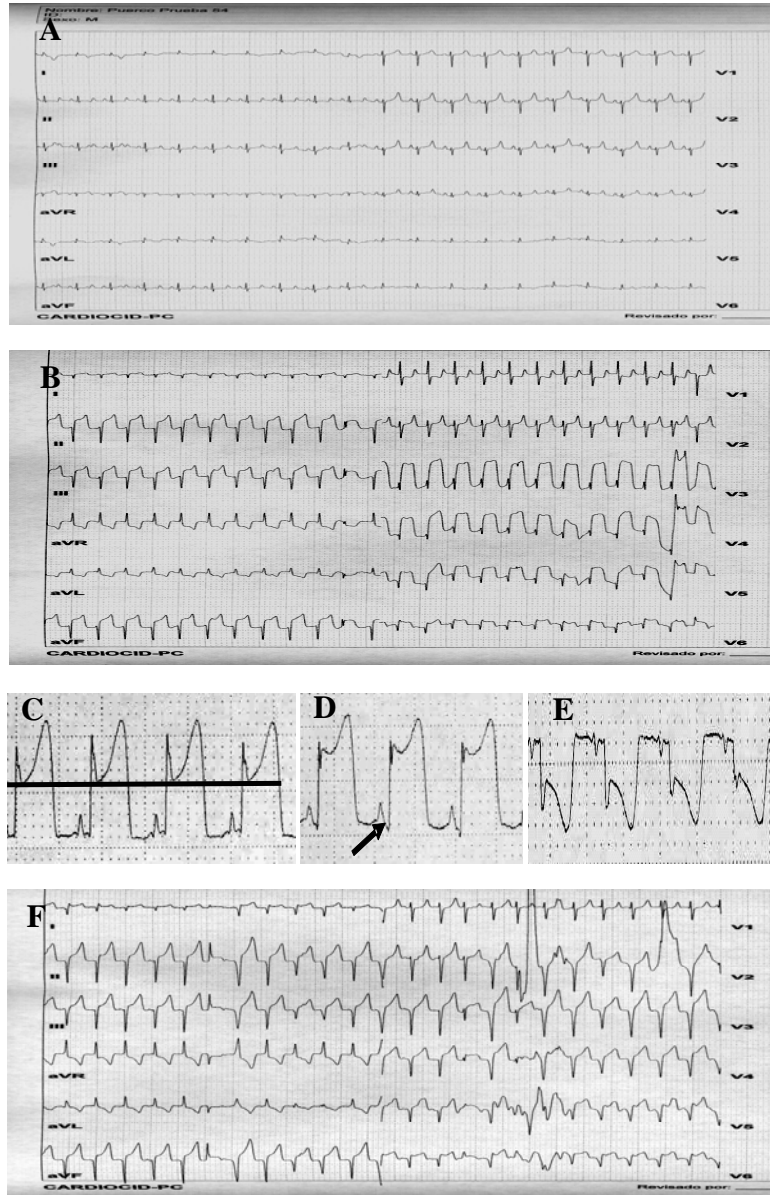
2-Parénquima de textura heterogénea, de granulado grueso.



Anexo 14. Estudio por laparotomía de las ratas de la fase de reversión de la cirrosis. Imágenes representativas de la clasificación macroscópica de los hígados fibróticos en: Micronodular (A, B); Macronodular (C, D) y Mixto (E, F). Las fotos del panel de la derecha corresponden a la cara parietal de los órganos, mientras que las fotos de la izquierda corresponden a la cara visceral de los mismos hígados.

Anexo 15. Metodología de las determinaciones histomorfométricas realizadas en el estudio de cirrosis hepática.

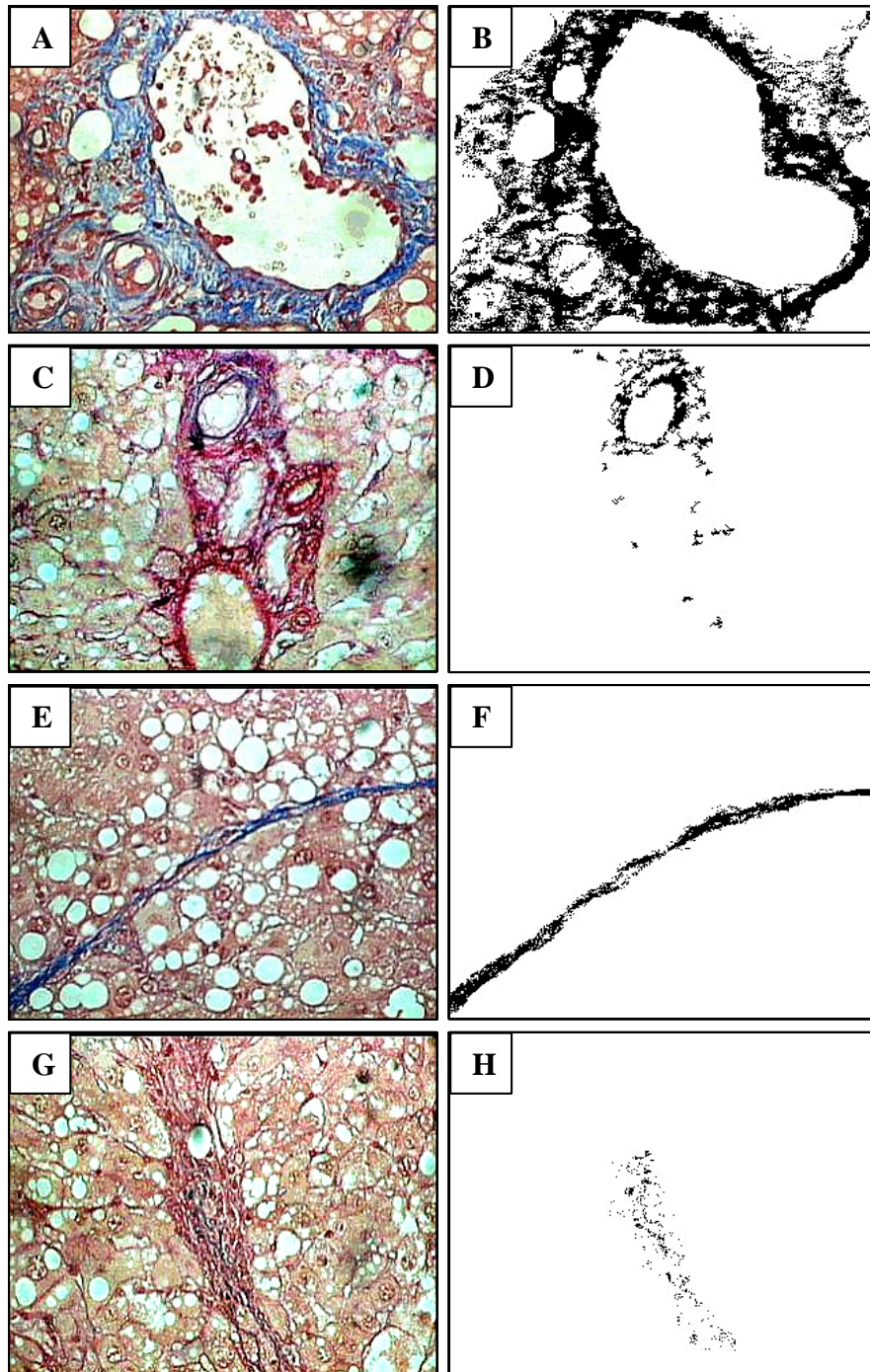
Parámetros morfométricos	# de campos examinados	Magnificación empleada	Distribución de los campos	Expresión del Resultado
Numero total de nódulos cirróticos	9	5X	3 campos por fragmento de hígado.	Promedio por fragmento de hígado examinado.
% de área cubierta por grasa (% Grasa)	9	10X	3 campos por fragmento de hígado.	Promedio por campos examinados.
% de área cubierta por material fibrótico (% Fibrosis)	9	10X	3 campos por fragmento de hígado.	Promedio por campos examinados.
Grosor de los Cordones (micras)	Ilimitados	40X	Escogidos al azar, entre todos los fragmentos de tejido, hasta completar 100 cordones por animal.	Promedio de todos los cordones fibróticos evaluados por animal.
% de fibras colágenas con respecto al área total de material fibrótico (% Colágeno)	12	40X	4 campos por fragmento de hígado. 6 campos de puentes intervasculares 6 campos de puentes perivasculares.	Promedio por campos examinados.



Anexo 16. Principales cambios detectados en el ECG durante la I/R miocárdica. (A) Se muestra el registro normal de las 12 derivaciones del ECG. (B) Principales cambios del ECG en la fase de Isquemia: marcado supradesnivel del segmento ST, deformación de los complejos QRS. Nótese que la T y la R se hacen a la misma altura, formando una meseta. (C) Se muestran ondas R picudas, el supradesnivel marcado del ST y onda T supradesnivelada, por encima de la R. (D) La flecha señala una onda Q patológica. (E) Se muestra imagen en espejo. (F) Imagen representativa de las arritmias de reperfusión durante los primeros minutos posteriores a la liberación de la arteria.

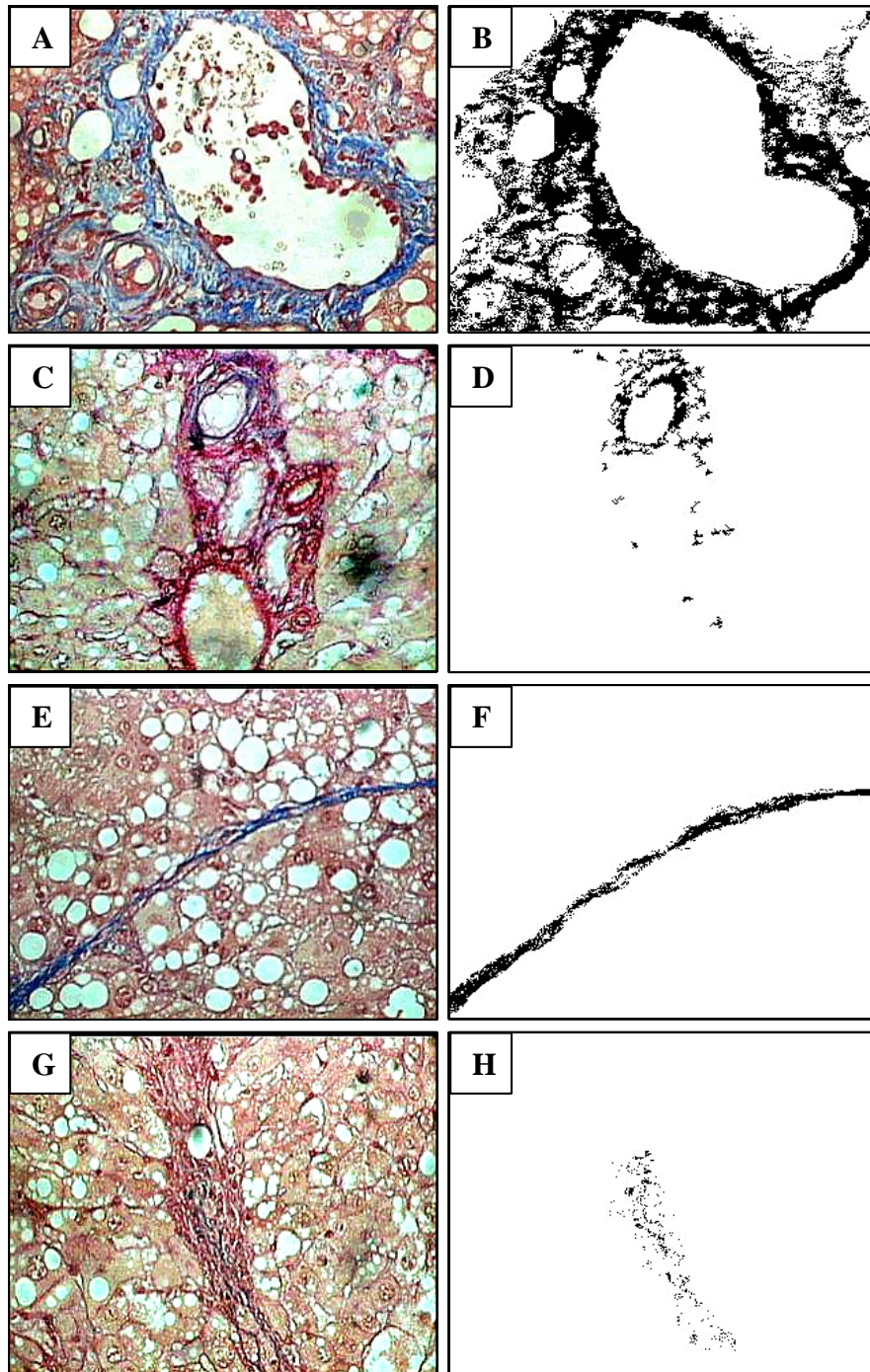
Anexo 17. Imagen de una rata con ascitis clínica.





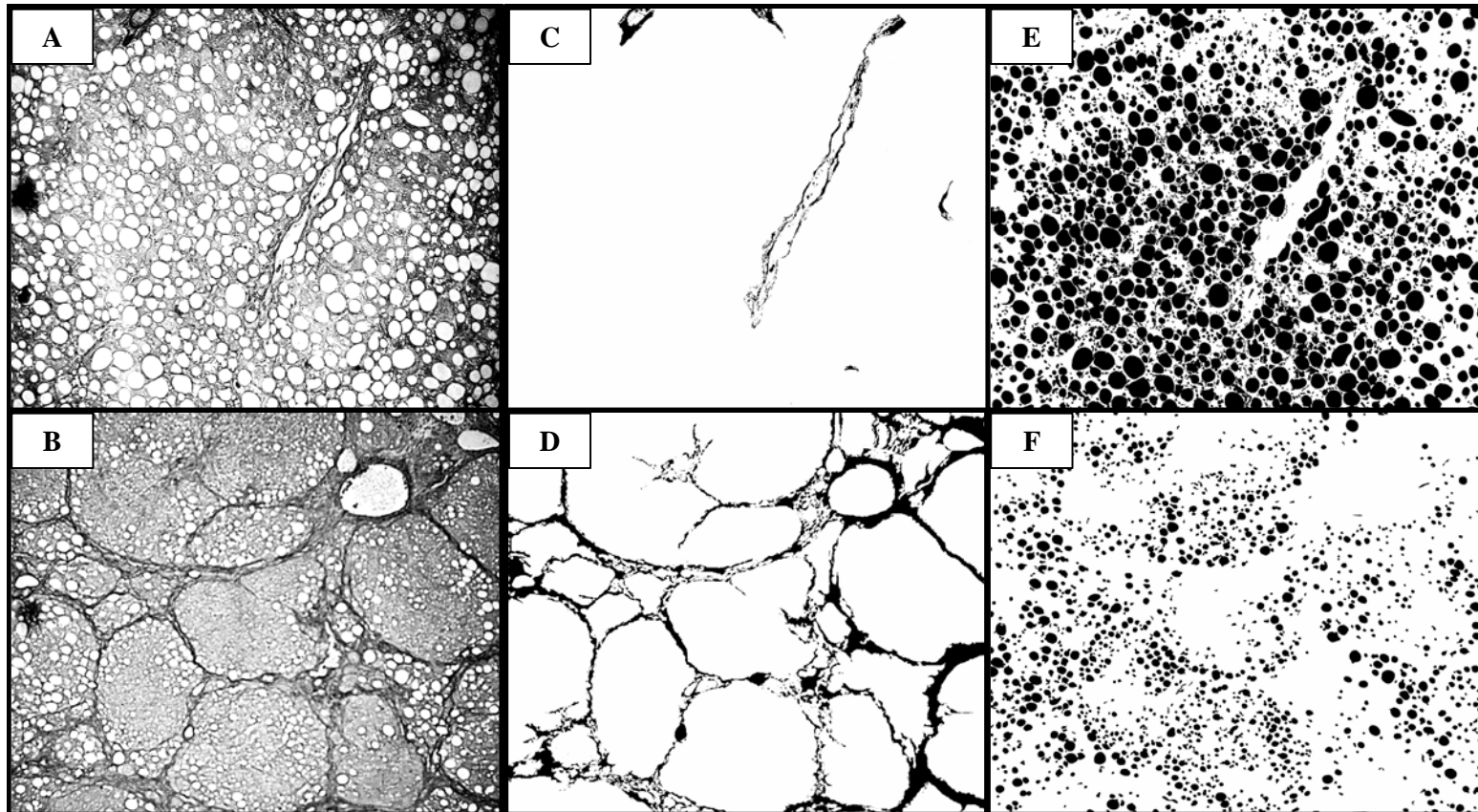
Anexo 18. Determinación del contenido de colágeno en áreas de depósito de material fibrótico.

Las imágenes de áreas de depósito de material fibrótico (magnificación 40X) fueron procesadas con el programa ImageJ. (A, B) Determinación del contenido de colágeno en un espacio perivascular, imagen representativa del grupo Placebo-15d. (C, D) Determinación del contenido de colágeno en un espacio perivascular, imagen representativa del grupo GHRP6-15d. (E, F) Determinación del contenido de colágeno en un cordón fibrótico, imagen representativa del grupo Placebo-15d. (G, H) Determinación del contenido de colágeno en un cordón fibrótico, imagen representativa del grupo GHRP6-15d.



Anexo 18. Determinación del contenido de colágeno en áreas de depósito de material fibrótico.

Las imágenes de áreas de depósito de material fibrótico (magnificación 40X) fueron procesadas con el programa ImageJ. (A, B) Determinación del contenido de colágeno en un espacio perivascular, imagen representativa del grupo Placebo-15d. (C, D) Determinación del contenido de colágeno en un espacio perivascular, imagen representativa del grupo GHRP6-15d. (E, F) Determinación del contenido de colágeno en un cordón fibrótico, imagen representativa del grupo Placebo-15d. (G, H) Determinación del contenido de colágeno en un cordón fibrótico, imagen representativa del grupo GHRP6-15d.



Anexo 19. Mediciones morfométricas del porcentaje de fibrosis y de grasa en los hígados cirróticos. Las imágenes digitales capturadas (magnificación 10X) fueron procesadas con el programa ImageJ. En esta figura se representa el resultado del procesamiento de dos imágenes para ambos parámetros evaluados. **(A, B)** Imágenes digitales de los hígados cirróticos (magnificación 10X). **(C, D)** Imágenes obtenidas del contenido de fibrosis. **(E, F)** Imágenes obtenidas del contenido de grasa en los hígados. Las imágenes **A, C, E** son representativas del grupo CCL4+GHRP6. Las imágenes **B, D, F** son representativas del grupo CCL4+Placebo.

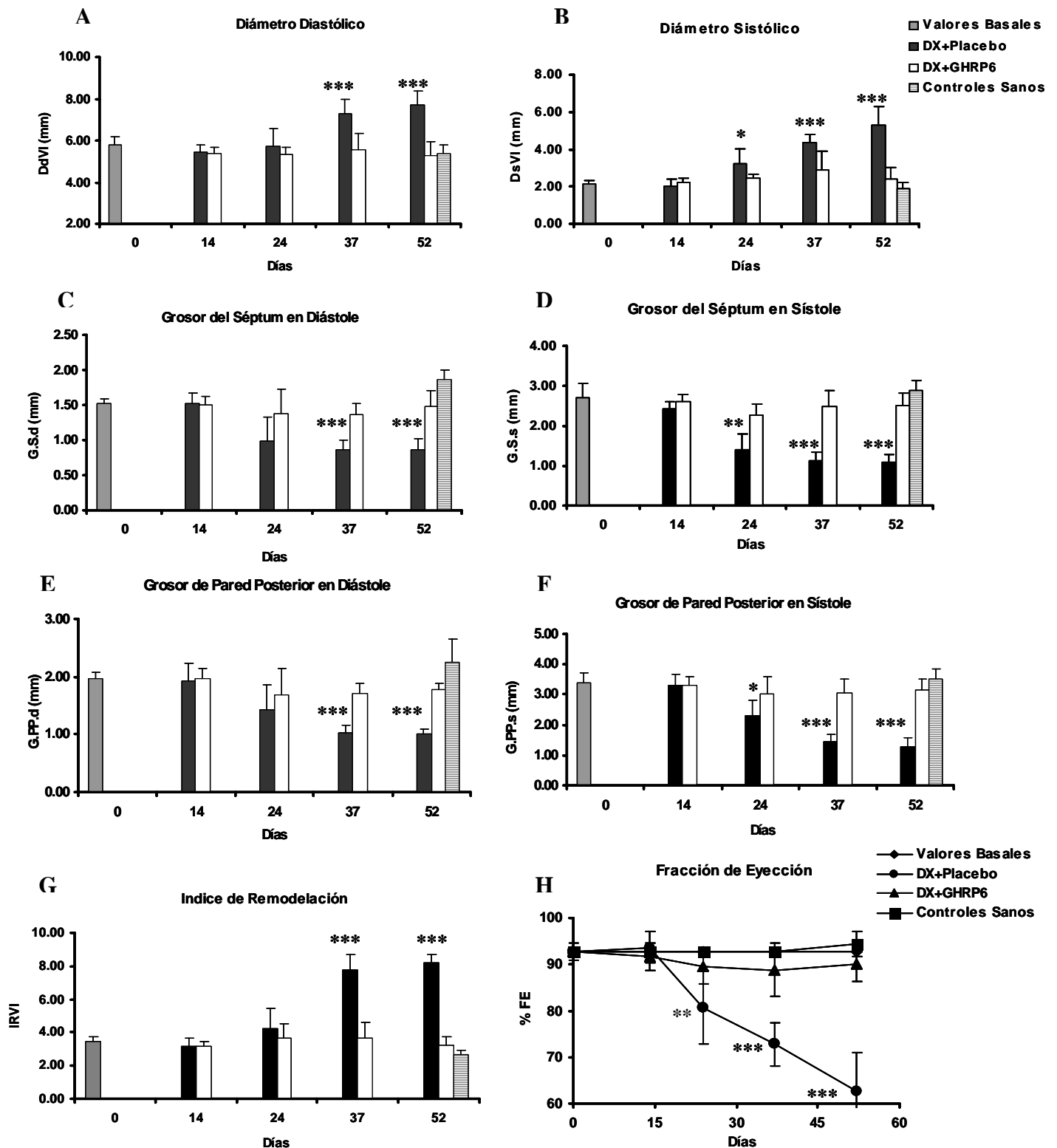


Figura 8. Resultados ecocardiográficos de la fase de prevención de la MCD. Todos los datos se representan como el promedio \pm DE por grupo experimental. Los Valores Basales corresponden al grupo Controles Sanos al inicio del experimento (n=12). Del grupo Controles Sanos se reporta también la evaluación realizada el día 52 (n=12). Los datos del grupo DX+Placebo corresponden a n=12 (días 14 y 24), n=9 (día 37) y n=5 (día 52); mientras que los datos del grupo DX+GHRP6 corresponden a n=12 (días 14, 24 y 37) y n=10 (día 52). Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados. Los asteriscos indican las diferencias estadísticas encontradas entre los grupos DX+GHRP6 y DX+Placebo vs los Valores Basales (días 14, 24 y 37), y vs Controles Sanos (día 52). (*) Indica p<0,05. (**) Indica p<0,01. (***) Indica p<0,001.

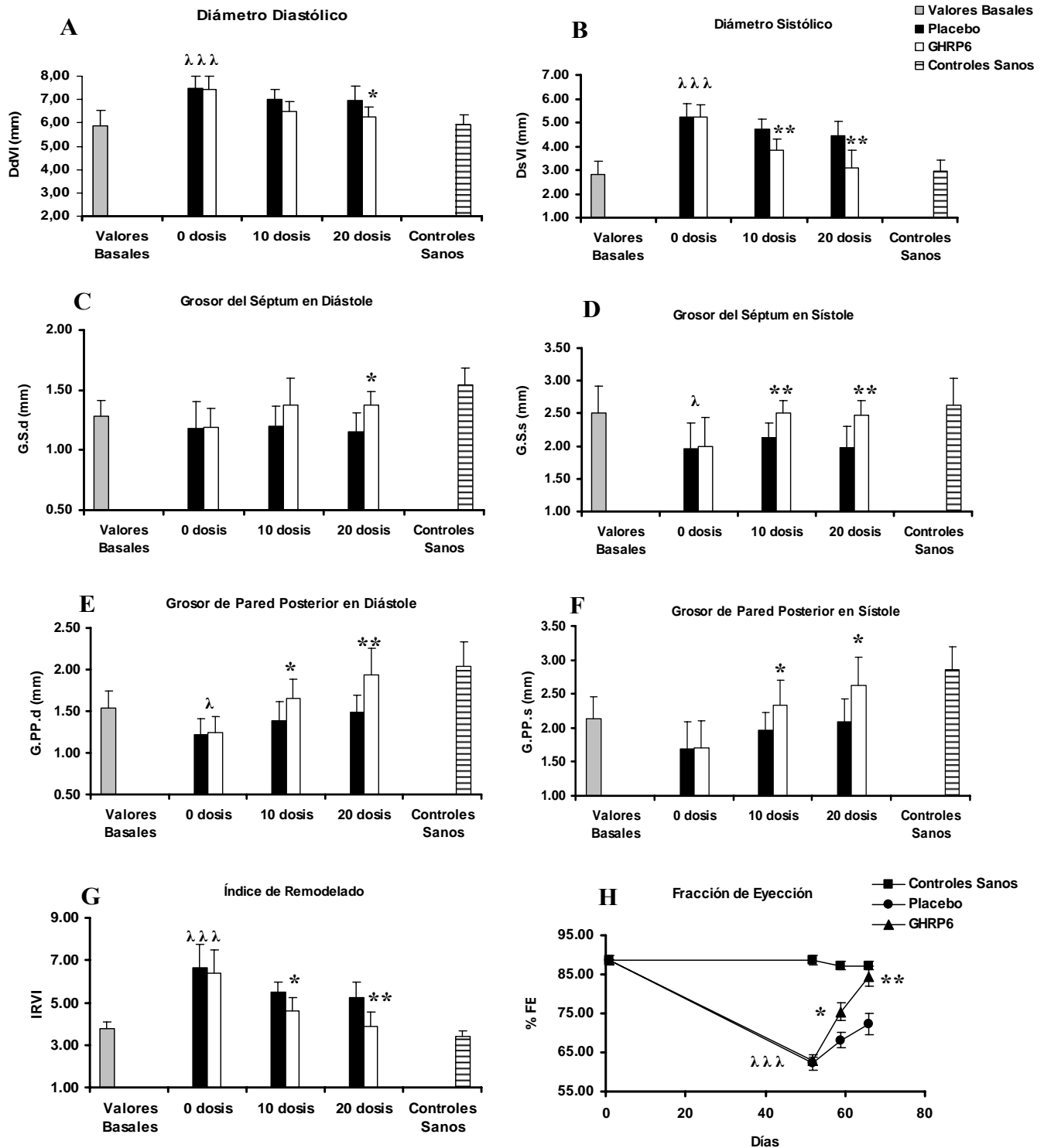


Figura 9. Resultados ecocardiográficos de la fase de reversión de la MCD. Los datos se representan como el promedio \pm DE por grupo experimental. Los Valores Basales corresponden al grupo Controles Sanos al inicio del experimento (n=12). Del grupo Controles Sanos se reporta también la evaluación del día final del estudio (n=12). Al inicio de la fase de reversión (0 dosis) y con 10 dosis de tratamientos, se estudiaron 12 ratas de los grupos Placebo y GHRP6. La evaluación con 20 dosis de tratamiento se realizó en 6 ratas del grupo Placebo y 11 ratas del grupo GHRP6. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba t para datos no pareados. Los asteriscos indican las diferencias encontradas entre los grupos GHRP6 vs Placebo, con 10 y 20 dosis de los tratamientos. (*) Indica $p < 0,05$. (**) Indica $p < 0,01$. (***) Indica $p < 0,001$. Los símbolos lambda indican la diferencia de los grupos Placebo y GHRP6, igual para ambos, al inicio de la fase de reversión (0 dosis) vs Valores Basales. (λ) Indica $p < 0,05$. ($\lambda\lambda\lambda$) Indica $p < 0,001$.

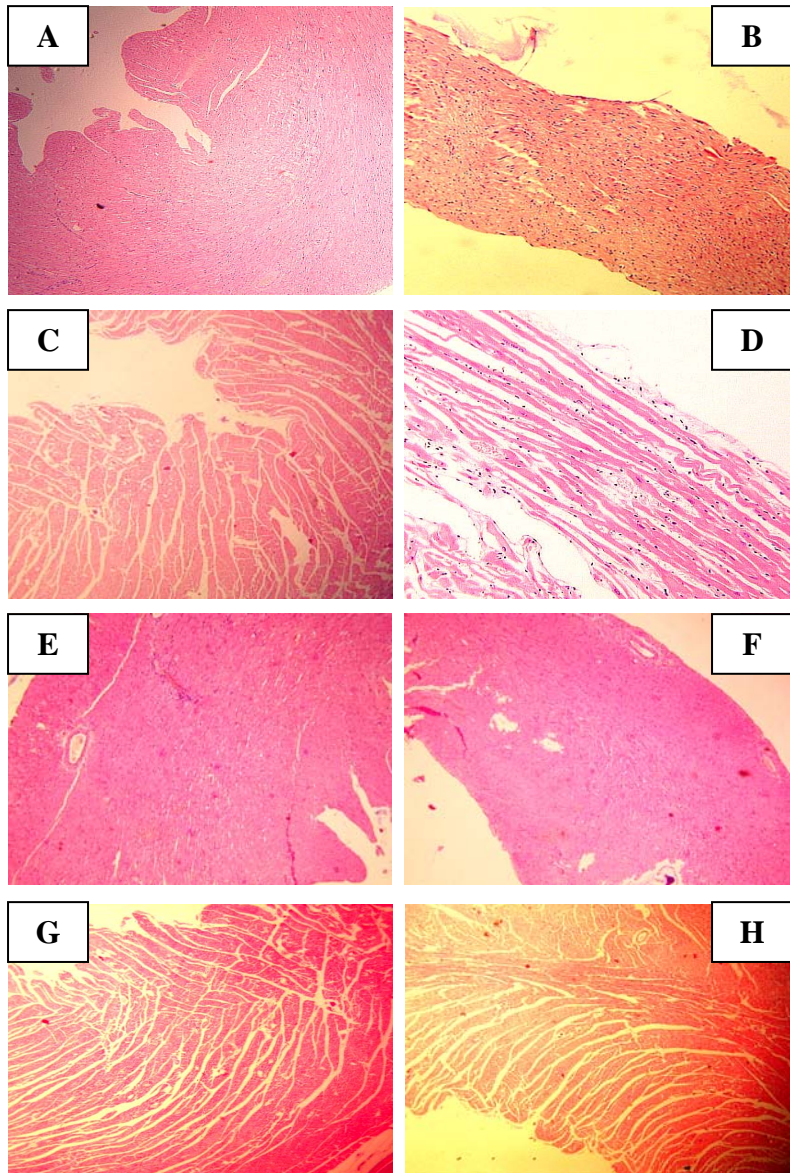


Figura 10. Imágenes histológicas del músculo cardíaco de las ratas del modelo de MCD. Las fotos del panel izquierdo corresponden al ventrículo izquierdo. Las fotos del panel de la derecha corresponden al ventrículo derecho. **(A, B)** Imágenes representativas de animales del grupo Controles Sanos. **(C, D)** Imágenes representativas de animales del grupo DX+Placebo, de la fase de prevención; e igualmente son representativas del grupo Placebo de la fase de reversión. **(E, F)** Imágenes representativas de animales del grupo DX+GHRP6, de la fase de prevención. **(G, H)** Imágenes representativas de animales del grupo GHRP6, de la fase de reversión. Todas las imágenes corresponden a una magnificación 5X.

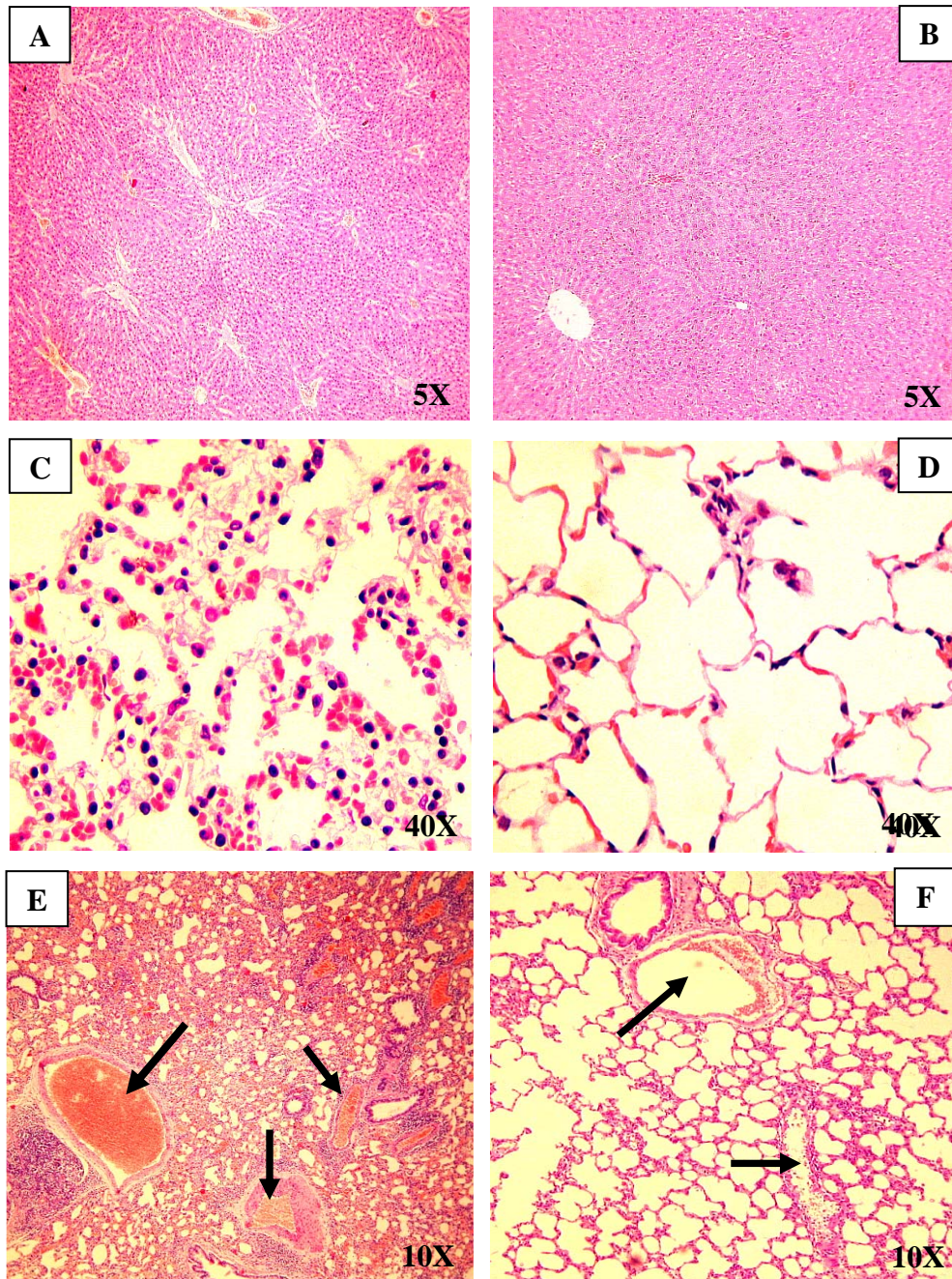


Figura 12. Evidencias histológicas del síndrome de Insuficiencia Cardíaca Congestiva. El panel de la izquierda corresponde al grupo DX+Placebo y el panel de la derecha corresponde al grupo DX+GHRP6; ambos de la fase de prevención de la MCD. En estas imágenes se muestra la atenuación inducida por el GHRP6 de los siguientes cambios patológicos: (A, B) Congestión pasiva hepática, nótese la mayor distensión de los espacios porta y los sinusoides en el grupo placebo; (C, D) Congestión septal pulmonar, nótese el incremento en el grosor del septo pulmonar en el grupo placebo; (E, F) Congestión pasiva pulmonar, indicada por las flechas.

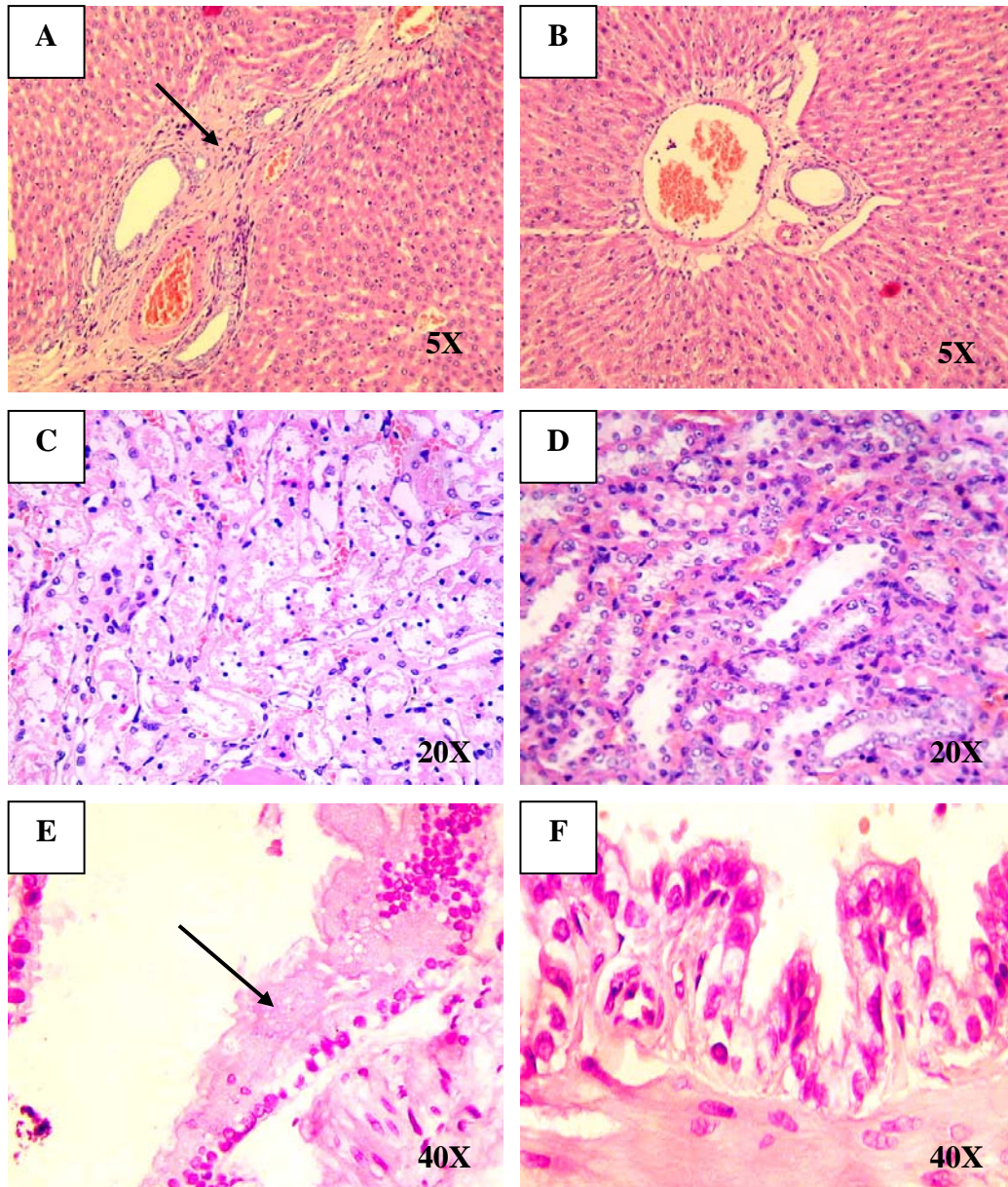


Figura 13. Daños extra-cardiacos inducidos en las ratas por la Doxorrubicina.

Las imágenes del panel de la izquierda corresponden al grupo DX+Placebo, y las imágenes del panel de la derecha corresponden al grupo DX+GHRP6; ambos de la fase de prevención de la MCD. (A, B) Imágenes de la reacción fibrótica peri-portal en el hígado del grupo placebo, indicada por la flecha. (C, D) Daño al epitelio tubular renal, nótese la apariencia denudada del epitelio en la imagen del grupo DX+Placebo. (E, F) Afectación del epitelio bronco-alveolar. La flecha indica una zona de necrosis coagulativa en el grupo placebo, donde desaparece la estructura de vellosidad propia de este epitelio. Nótese la diferencia en los animales tratados con el GHRP6 en todas las formas de daño inducidas por la DX señaladas anteriormente.

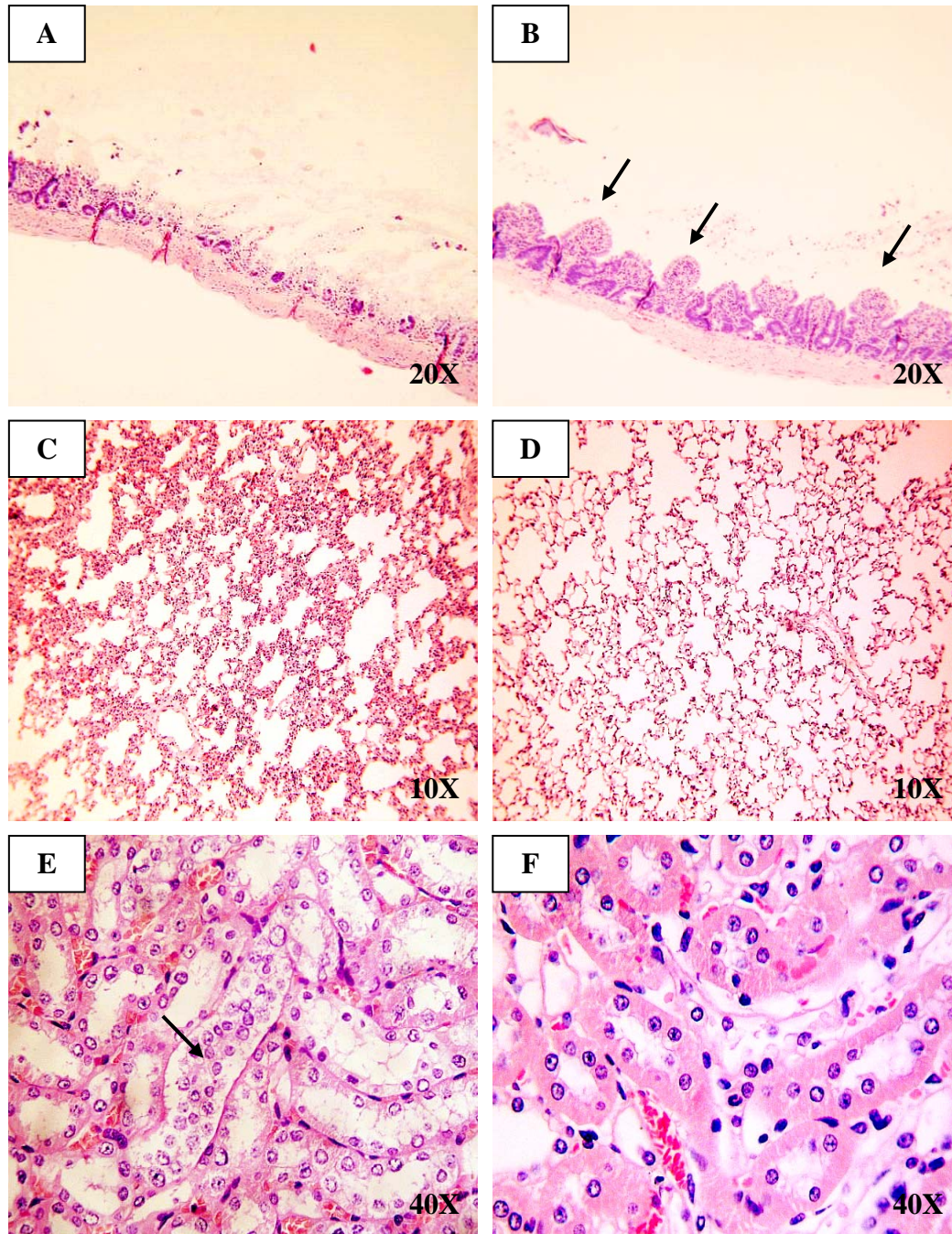


Figura 20. Daños en tejidos extra-hepáticos inducidos por la reperusión del hígado.

Las imágenes del panel de la izquierda corresponden al grupo Placebo+I/R. Las imágenes del panel de la derecha corresponden al grupo GHRP6+I/R. En estas imágenes se muestra la atenuación inducida por el GHRP6 de los siguientes cambios patológicos: (A, B) Daños en la mucosa intestinal; nótese la pérdida total de las vellosidades en el grupo placebo (indicadas por las flechas en el grupo GHRP6+I/R). (C, D) Daño pulmonar; nótese el aumento de grosor del septo pulmonar en el grupo placebo. (E, F) Daños en el epitelio tubular de los riñones. Nótese la apariencia denudada del epitelio de los túbulos del grupo placebo, la flecha indica el desprendimiento del collar de células epiteliales.

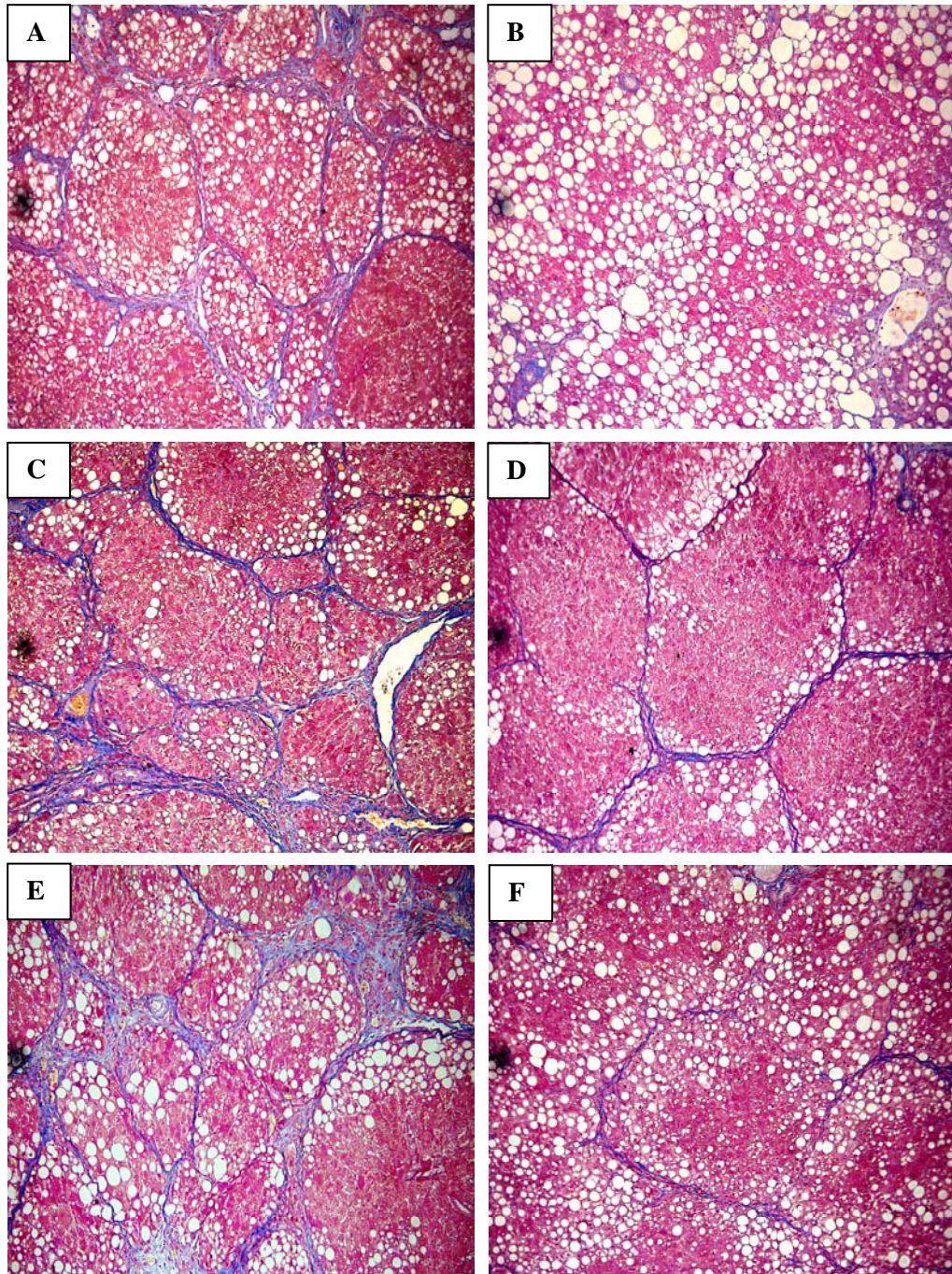


Figura 24. Imágenes histológicas representativas de los hígados cirróticos. (A) Grupo CCL4+Placebo; (B) Grupo CCL4+GHRP6; (C) Grupo Placebo-15d; (D) Grupo GHRP6-15d; (E) Grupo Placebo-60d; (F) Grupo GHRP6-60d. Todas las imágenes corresponden a una magnificación 10X y a la coloración especial Tricrómica de Mallory. El color azul destaca el depósito de fibras colágenas. Nótese el depósito de grasa en forma de gotas, de color blanco.

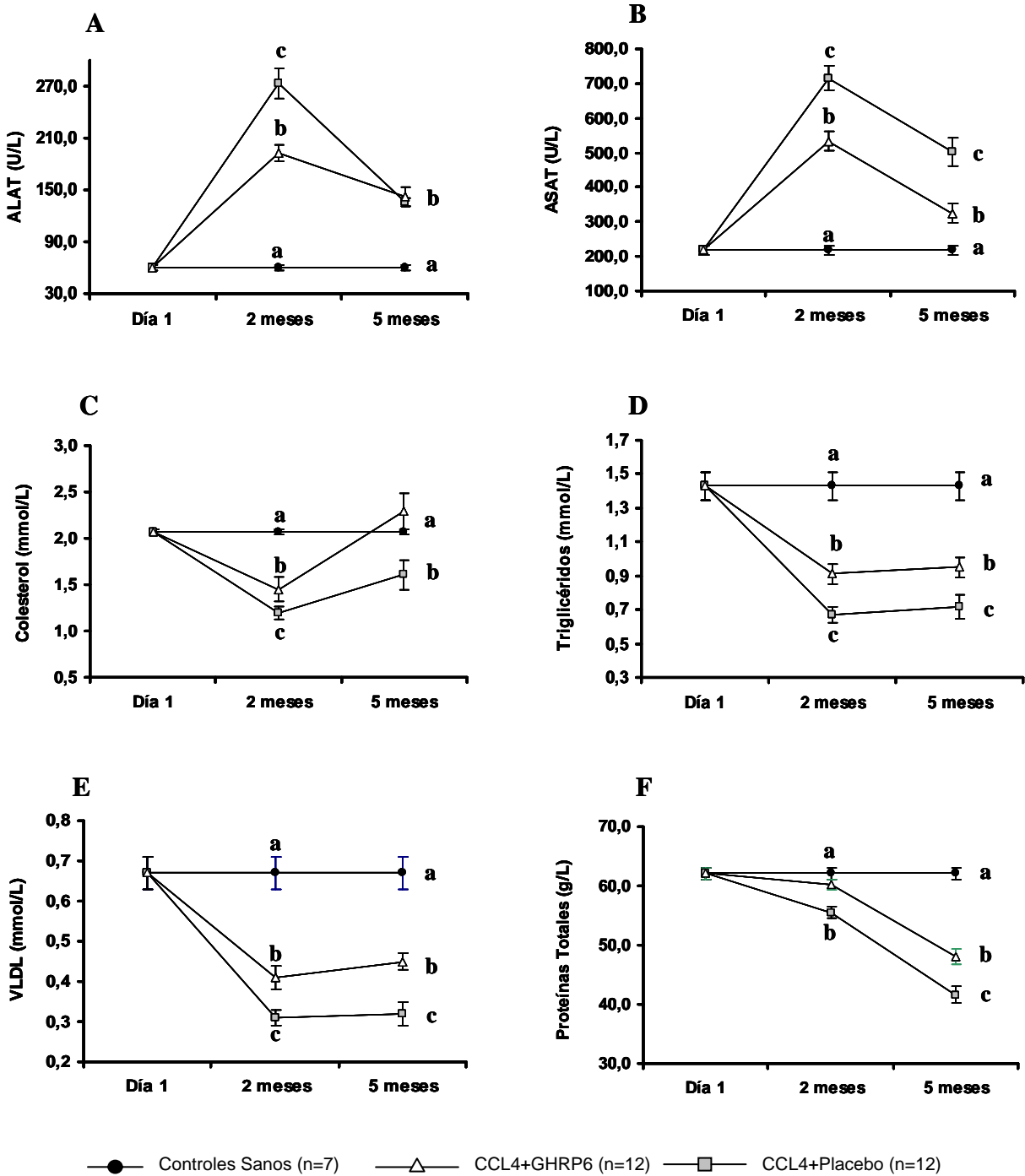


Figura 25. Evaluaciones bioquímicas de la fase de prevención de la Cirrosis. Las determinaciones se realizaron en muestras de suero obtenidas al finalizar el segundo y quinto mes de administración del CCL₄ y los tratamientos concomitantes. Los datos se presentan como el promedio ± el EEM por grupo experimental. Para las comparaciones estadísticas múltiples realizadas entre los tres grupos, en cada punto de evaluación, se empleó un ANOVA seguido por la prueba t de Neuman Keuls. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

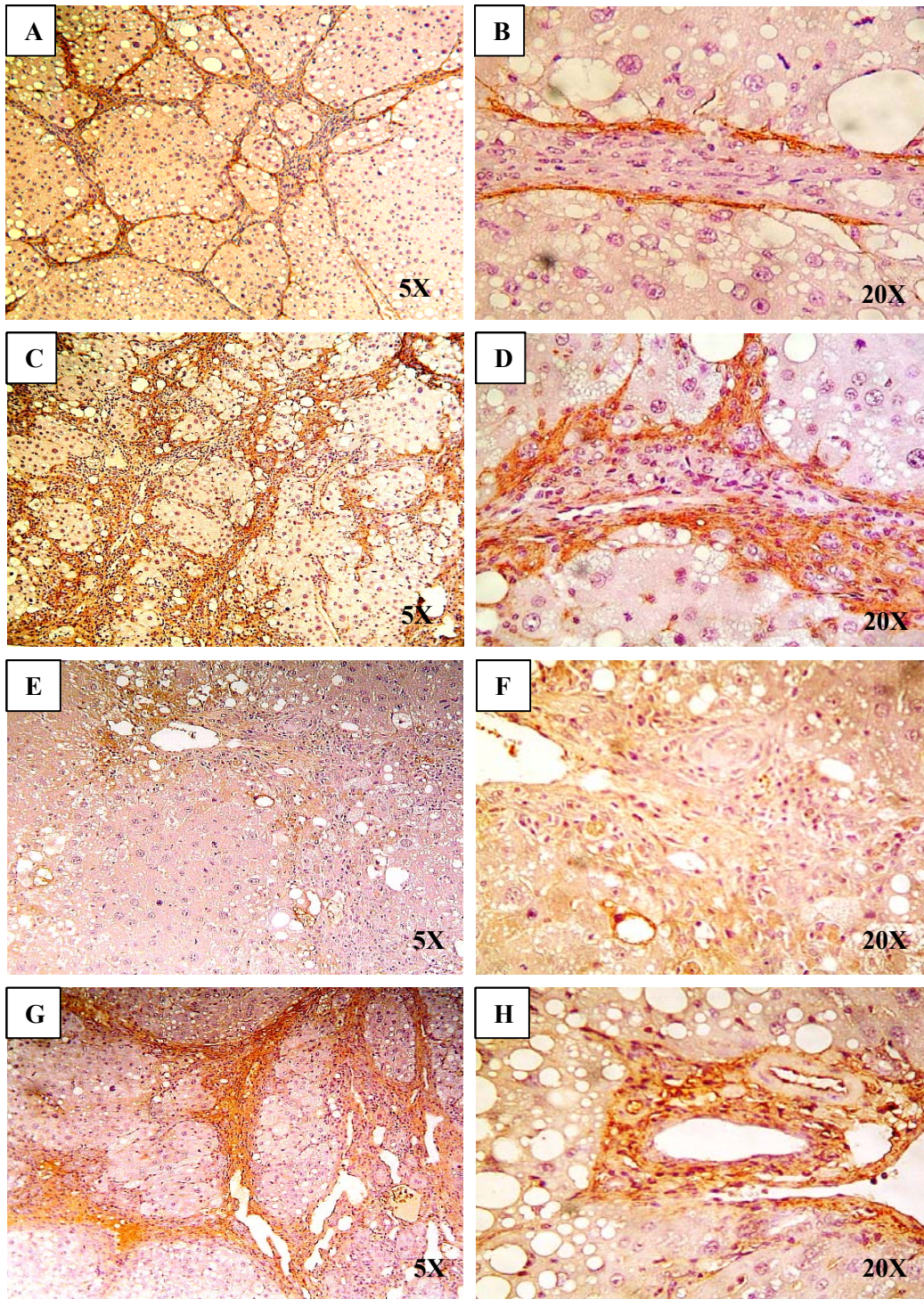


Figura 26. Detección inmunohistoquímica de α SMA y TGF- β en los cordones fibróticos. (A,B) Imágenes representativas de la expresión de α SMA en los animales tratados con el GHRP6; fotos correspondientes al grupo GHRP6-15d. (C,D) Imágenes representativas de la expresión de α SMA en los animales que recibieron el placebo; fotos correspondientes al grupo Placebo-15d. (E,F) Imágenes representativas de la expresión de TGF- β en los animales tratados con el GHRP6; fotos correspondientes al grupo GHRP6-60d. (G,H) Imágenes representativas de la expresión de TGF- β en los animales que recibieron el placebo; fotos correspondientes al grupo Placebo-60d.

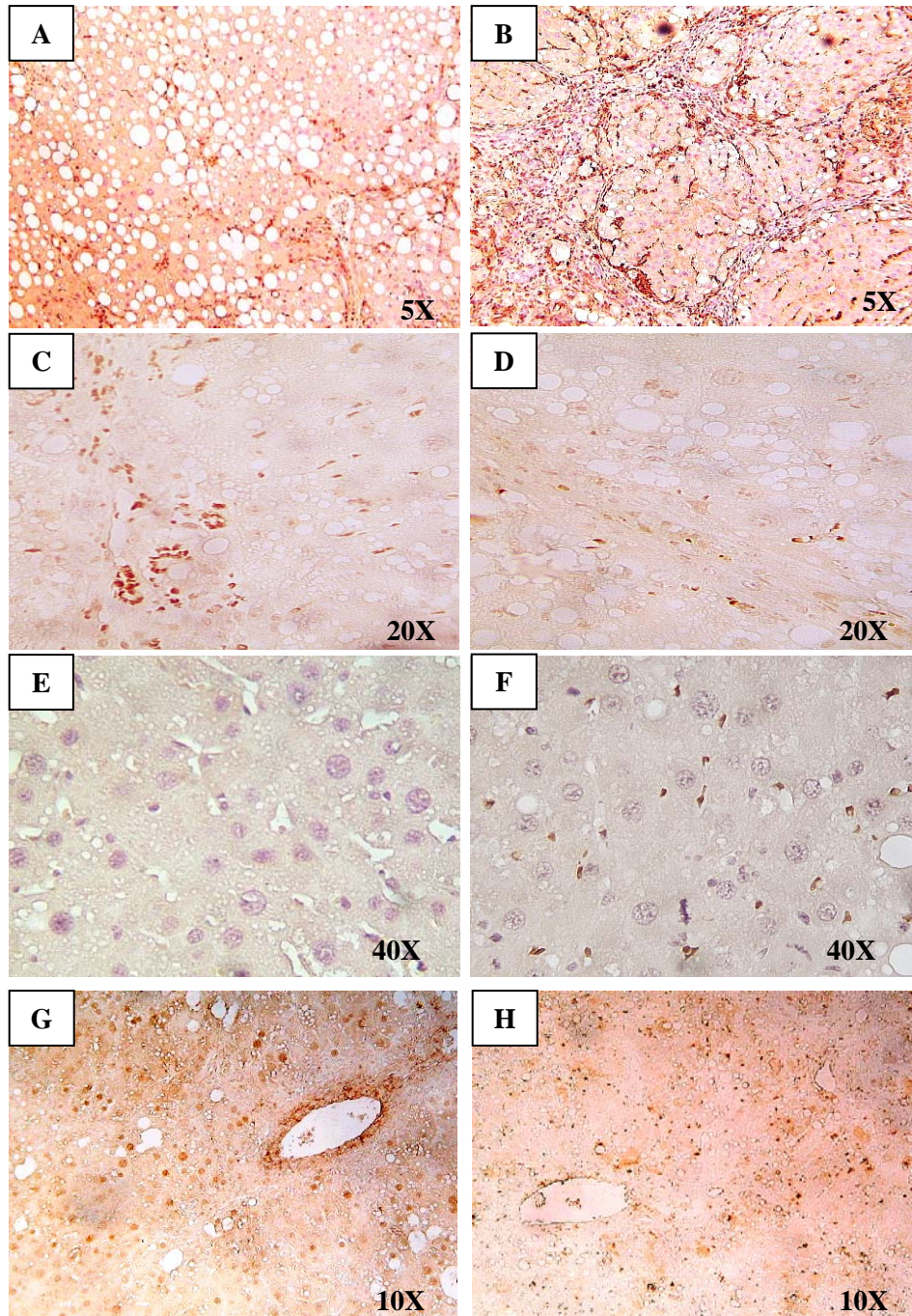


Figura 27. Detección inmunohistoquímica de Vimentina, p53, Fas-L y Ciclina D1 en la Cirrosis. Las imágenes de la izquierda corresponden a los grupos tratados con el GHRP6, mientras que las imágenes de la derecha corresponden a los grupos placebo. (A, B) Imágenes representativas de la expresión de Vimentina, fotos de los grupos CCL4+GHRP6 y CCL4+Placebo. (C, D) Imágenes representativas de la expresión de p53, fotos de los grupos GHRP6-15d y Placebo-15d. (E, F) Imágenes representativas de la expresión de Fas-L, fotos de los grupos GHRP6-60d y Placebo-60d. (G, H) Imágenes representativas de la expresión de Ciclina D1, fotos de los grupos GHRP6-15d y Placebo-15d.

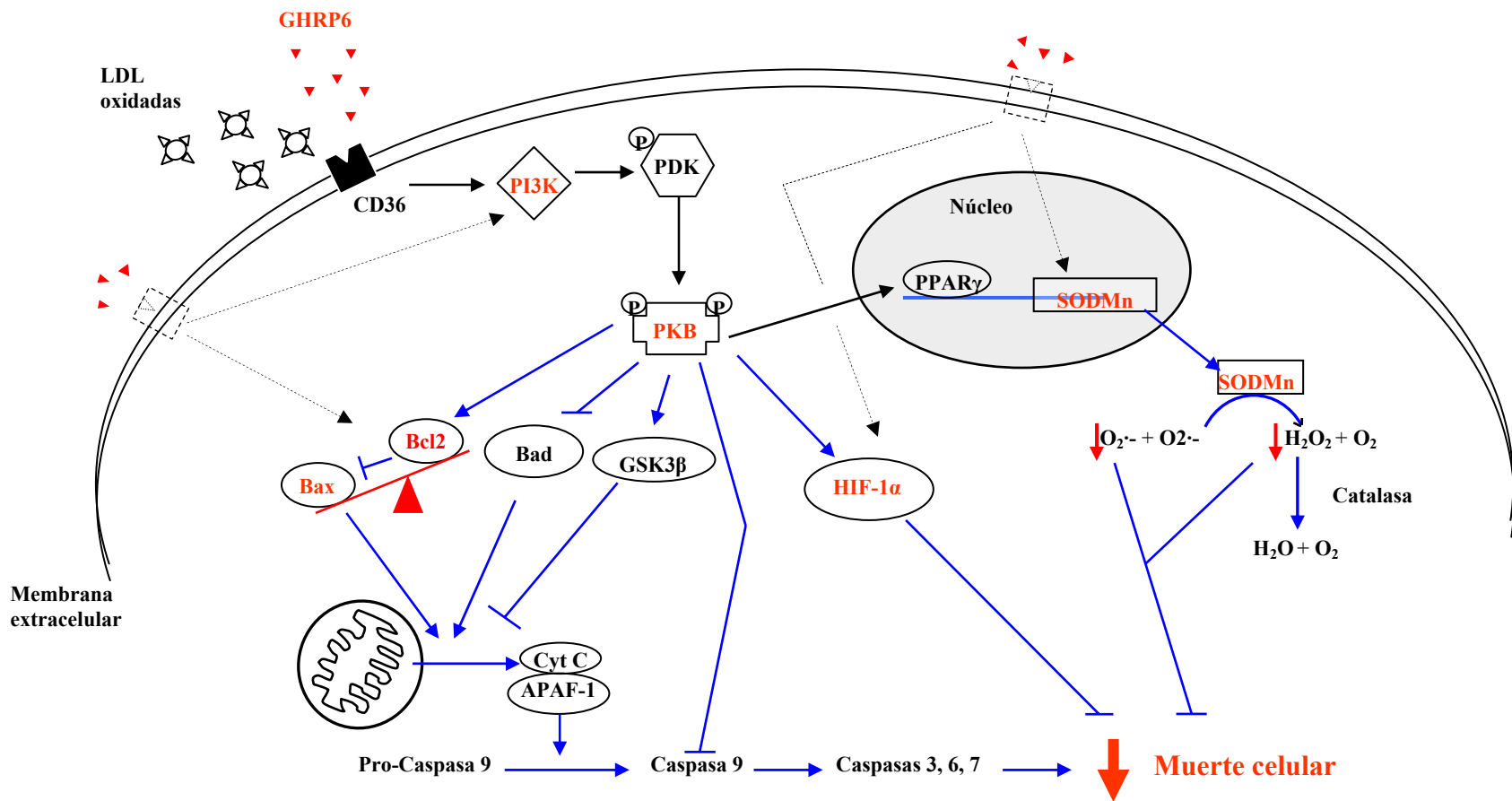


Figura 30. Propuesta del mecanismo molecular que media los efectos citoprotectores del péptido GHRP6. Las flechas negras continuas representan el mecanismo molecular establecido para la activación de la ruta PI3K/PKB y del PPAR γ que se produce por la interacción de las LDL oxidadas con el receptor CD36. Esta ruta puede potencialmente ser compartida por el GHRP6, ya que este péptido posee el mismo sitio de unión al CD36 que las LDL oxidadas. Las flechas y líneas azules continuas indican los conocimientos establecidos en la literatura internacional sobre el papel de la PKB en la inhibición de la apoptosis, así como la función del PPAR γ en la regulación transcripcional de la enzima antioxidante SODMn. En color rojo se representan los elementos de estas rutas que han sido confirmados en los presentes estudios con el GHRP6. En flechas negras discontinuas se representa la posibilidad de que exista un nuevo receptor para los GHRP que sea el responsable de las acciones demostradas.

