

## **GHRP-6: UN CANDIDATO NOVEDOSO PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE DESÓRDENES FIBRÓTICOS**

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

**AUTORES PRINCIPALES:** Jorge Berlanga Acosta (CIGB) e Yssel Mendoza Marí (CIGB)

**OTROS AUTORES:** Maday Fernández Mayola (CIGB) Dra. Dania Vázquez Blomquist (CIGB), Ariana García Ojalvo (CIGB), José Suárez Alba (CIGB), Gerardo Guillén Nieto (CIGB), Ana Aguilera Barreto (CIGB), Yilian Bermúdez Álvarez (CIGB), Dayana Ugarte Moreno (CIMEQ), Diana García del Barco Herrera (CIGB), Ernesto López Mola (CIGB), Manuel Selman-Hussein (CIGB)

**COLABORADORES DEL CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA:** María Elena Ochagavía Roque, Jamilet Miranda Navarro, Ricardo Bringas Pérez, Karelía Cosme Díaz, Daniel Palenzuela Gardón, Julio Raúl Fernández Massó, Isabel Guillén Pérez, Alberto Cintado Benítez, Lidia Inés Novoa, José Ángel Silva Guirado, Regla Estrada Vázquez

**COLABORADORES DE OTRAS INSTITUCIONES:** Ana Janet Mir Benítez. Hospital Clínico Quirúrgico "Joaquín Albarrán", Yolanda González Ferrer. Centro de investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ), José M. Vila. Centro de investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ), Angel Abreu. Centro de investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ), Yolanda Cruz. Centro de investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ), Ivon Howland. Centro de investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ), Rosa María Coro Antich. Instituto de Neurología y Neurocirugía, Olga Sonia León Fernández. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Aleida Urquiza. Centro de investigaciones Médico Quirúrgicas (CIMEQ)

**AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:**

Yssel Mendoza Marí.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa. Apdo. postal 6162, CP 10600. La Habana, Cuba.

Tel: 7250 4483.

Fax: 7273 6008.

E-mail: [yssel.mendoza@cigb.edu.cu](mailto:yssel.mendoza@cigb.edu.cu)

## RESUMEN

La fibrosis se define como la acumulación patológica de proteínas de la matriz extracelular (MEC) durante la respuesta reparativa tisular frente a un daño de naturaleza mecánica, química o biológica y que interfiere con el funcionamiento del órgano o tejido en cuestión. La incidencia de este tipo de padecimientos a nivel mundial es muy alta y hasta el momento muchos de ellos no tienen tratamientos preventivos o curativos.

El péptido liberador de la hormona de crecimiento tipo 6 (GHRP-6) posee demostradas propiedades anti-inflamatorias, anti-oxidantes y citoprotectoras y un buen perfil de seguridad. Estos efectos mediados por el péptido, en tejidos cardíaco y extracardíaco, constituyeron Premio de la Academia de Ciencias de Cuba en el año 2007.

Las primeras observaciones del efecto anti-fibrótico del GHRP-6 se obtuvieron en el modelo de miocardiopatía dilatada inducida por doxorubicina en ratas. Se vio que el péptido era capaz de atenuar la fibrosis periportal en el hígado y reducir la reacción cicatrizal fibrótica en los intersticios y el estroma renales. Para estudiar esta nueva propiedad del GHRP-6, se evaluó su efecto en un modelo de cirrosis hepática en ratas mediado por inyección de CCl<sub>4</sub>. Se demostró por primera vez que el tratamiento con el péptido, tanto en un escenario preventivo como terapéutico, redujo la induración fibrótica en más del 75%, el grosor de los cordones y el número de nódulos cirróticos hasta en un 60%. El GHRP-6 también exhibió un claro efecto hepato-protector, caracterizado por la atenuación del proceso necro-inflamatorio del hígado, la estimulación de la proliferación de los hepatocitos, y el rescate del balance redox celular. En un modelo de herida simple en rata, el péptido incrementó la velocidad del cierre de las heridas y disminuyó el infiltrado inflamatorio, aspectos que redundaron en una mejor calidad del proceso de cicatrización. Finalmente, en el modelo de queloide en conejos, el péptido previno el desarrollo de este tipo de cicatriz exuberante en más del 90% de las heridas tratadas y redujo la intensidad de la respuesta fibrogénica. Desde el punto de vista del mecanismo de acción, se comprobó por primera vez, en los tres modelos abordados, que el GHRP-6 disminuye la expresión transcripcional de factores pro-fibróticos, como el TGF- $\beta$ 1 y el CTGF, lo que se tradujo en una menor expresión de genes que codifican para proteínas de la MEC. Por otra parte, se describió por primera vez el efecto inductor del péptido sobre la expresión del factor transcripcional PPAR $\gamma$  y sobre la metaloproteasa de matriz MMP-13, ambas moléculas importantes en la inhibición del proceso acumulativo patológico. Estos resultados han sido objeto de una patente internacional y tres publicaciones internacionales.

## COMUNICACIÓN CORTA DE LOS RESULTADOS

### Introducción

La fibrosis se define como la acumulación patológica de proteínas de la matriz extracelular (MEC) durante la respuesta reparativa tisular frente a un daño de naturaleza mecánica, química o biológica y que interfiere con el funcionamiento del órgano o tejido en cuestión (1). Entre las enfermedades que comprenden este proceso se encuentran la cirrosis hepática, la fibrosis quística y los queloides, entre otras. La incidencia de este tipo de enfermedades a

nivel mundial es muy alta, sobre todo en países desarrollados, y hasta el momento muchas de ellas no tienen tratamientos preventivos o curativos (2).

El GHRP-6 (del inglés: Growth Hormone Releasing Peptide-6), es un péptido sintético de seis aminoácidos, cuya secuencia corresponde a: His-D Trp-Ala-Trp-D Phe-Lys-NH<sub>2</sub>. Originalmente se obtuvo como un derivado sintético de la metaencefalina intestinal (3). En la actualidad, este péptido, así como otros análogos sintéticos, se emplean como agentes secretagogos para el diagnóstico clínico diferencial de las diferentes formas de enanismo (4). El GHRP-6 posee demostradas propiedades anti-inflamatorias, anti-oxidantes y citoprotectoras y un buen perfil de seguridad (5).

Un hallazgo fortuito de nuestro grupo de trabajo, estableció las primeras observaciones de que el GHRP-6 instaura un programa celular de degradación o remoción del exceso de MEC en órganos parenquimatosos. Ratas que recibieron reiteradas dosis de doxorubicina para la inducción de una miocardiopatía dilatada, desarrollaron una intensa fibrosis intersticial en hígado, riñones y pulmones. El examen histológico ulterior demostró una sustancial disminución de la acumulación de material colágeno en los animales tratados con GHRP-6 *versus* aquellos que recibieron una solución placebo (observaciones no publicadas).

Para estudiar de forma rigurosa estos hallazgos meramente circunstanciales, se caracterizó el efecto anti-fibrótico del péptido en varios modelos experimentales. En primer lugar se evaluó la molécula en un modelo de cirrosis hepática en ratas, mediada por intoxicación con tetracloruro de carbono, en escenarios preventivo y terapéutico, en este último durante dos tiempos experimentales diferentes. Posteriormente, una vez demostrada la expresión en piel del receptor CD36, mediador de los efectos citoprotectores del GHRP-6 (6), se ensayó la aplicación tópica de una composición viscosa que contenía el péptido en el modelo de herida simple en rata y luego en el modelo de formación de queloides en conejos. Los resultados que se obtuvieron en dichos experimentos se describirán brevemente a continuación.

### Evaluación del efecto anti-fibrótico del GHRP-6 en un modelo de cirrosis hepática mediada por intoxicación con tetracloruro de carbono en ratas

Se evaluó el efecto del tratamiento con GHRP-6 en esquemas de administración concomitante al hepatotóxico (prevención) o posterior a la inducción de la cirrosis, durante 15 ó 60 días (reversión). Se cuantificó el porcentaje de fibrosis, la nodularidad y el grosor septal mediante estudios histomorfométricos y la ascitis o dilatación portal por ultrasonido. Se determinó el perfil bioquímico y los parámetros de estrés oxidativo en suero, así como la participación de genes y proteínas, mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa e inmunohistoquímica.

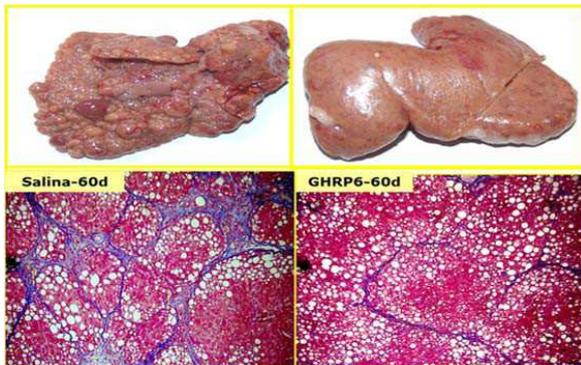
**Tabla 1.** Resultados de los estudios de ultrasonido hepático

Experimental groups	N	UFI	Portal diameter (mm)	Ultrasound ascites (%)
Intact control	7	0	0.71 ± 0.05	0
CCl <sub>4</sub> + GHRP6	12	2.50 ± 0.30	0.80 ± 0.06	2(17)
CCl <sub>4</sub> + Saline	12	5.93 ± 0.79***	1.12 ± 0.14*	8(67)
GHRP6-60d	12	4.80 ± 0.42	0.96 ± 0.08	3(25)
Saline-60d	12	7.00 ± 0.29***	1.34 ± 0.13*	8(67)

**Tabla 2.** Resultados de los estudios histomorfométricos

Experimental groups	N	Septae thickness	Nodules/mm <sup>2</sup>	Fibrosis (%)
CCl <sub>4</sub> + GHRP6	12	10.97 ± 1.66***	0.82 ± 0.23***	1.99 ± 0.31***
CCl <sub>4</sub> + Saline	12	72.13 ± 7.85	5.58 ± 0.52	16.80 ± 0.63
GHRP6-15d	10	47.31 ± 4.62**	3.80 ± 0.41	9.80 ± 1.15***
Saline-15d	10	71.63 ± 4.67	5.00 ± 0.44	15.63 ± 0.67
GHRP6-60d	12	34.62 ± 4.36***	2.24 ± 0.42***	4.93 ± 0.65***
Saline-60d	12	102.73 ± 8.14	5.90 ± 0.43	19.37 ± 0.68

CCl<sub>4</sub> + tratamiento: Esquema preventivo. Tratamiento-15d: Esquema terapéutico de 15 días. Tratamiento-60d: Esquema terapéutico de 60 días. UFI: Índice de fibrosis por ultrasonido. (\*/\*\*/\*\*\*) indican diferencias significativas entre los animales tratados con el GHRP-6 y sus contrapartes tratados con salina, al menos para \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 1.** Se muestran imágenes representativas de los hígados tratados con GHRP-6 o solución salina, desde el punto de vista macroscópico e histológico (tinción tricrómica de Mallory)

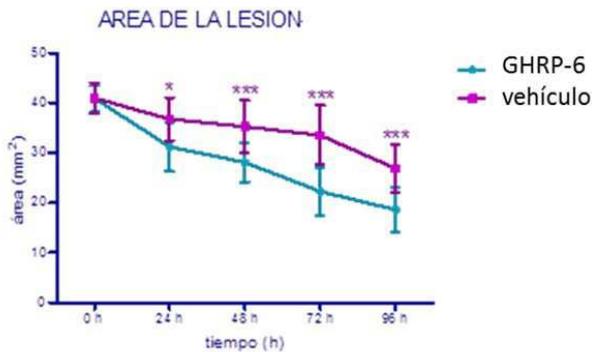
El tratamiento con el GHRP-6 redujo de forma significativa los marcadores de fibrosis como índice de fibrosis, diámetro portal, presencia de ascitis, grosor de los tabiques y cantidad de nódulos por campo, tanto desde el punto de vista ultrasonográfico (Tabla 1) como histológico (Tabla 2), en ambos tipos de administraciones, concomitante y terapéutica. La Figura 1 muestra imágenes representativas de la estructura macroscópica e histológica de los hígados, antes y después de la intervención con el péptido. Desde el punto de vista funcional, se observó que el péptido atenuó de forma significativa el incremento drástico de los valores de las transaminasas aspartato-aminotransferasa y alanina-aminotransferasa, que ocurrió en los animales producto de la administración del hepatotóxico. Por otra parte, el GHRP-6 redujo significativamente los niveles de marcadores de stress oxidativo como hidroperóxidos totales, productos avanzados de la oxidación de proteínas, malondialdehído y potencial de peroxidación lipídica, con respecto a los animales tratados con solución salina ( $p < 0,01$ ) en los tres ensayos experimentales realizados. De forma concurrente, incrementó la actividad de las enzimas anti-oxidantes catalasa y superóxido dismutasa ( $p < 0,05$ ). En sentido general se concluyó que el tratamiento con el péptido permitió eliminar y controlar el depósito de material colágeno y de MEC en el parénquima hepático, además de ejercer un marcado efecto hepatoprotector y promotor de proliferación. Los resultados concernientes a este modelo experimental se anexan en la siguiente publicación:

Growth Hormone Releasing Peptide 6 (GHRP6) reduces liver fibrosis in CCl<sub>4</sub> chronically intoxicated rats. Berlanga J, Vázquez D, Cibrián D, Mendoza Y, Ochagavía ME, Miranda J y cols. *Biotechnología Aplicada* 2012; 29:60-72.

### **Aplicación tópica de un gel de carboximetilcelulosa que contiene GHRP-6 en el modelo de herida simple en rata**

Se aplicó una formulación de GHRP-6 (400  $\mu\text{g/mL}$ ) en gel de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% durante 4 días en heridas de grosor total, controladas, que se practicaron en el dorso de

ratas Wistar machos. Como se muestra en la Figura 2, la administración de GHRP-6 incrementó el cierre de las heridas de forma significativa, en comparación al vehículo (CMC 1%), desde las primeras 24 horas de la administración inicial del péptido ( $p=0,016$ ) y hasta el final del experimento ( $p<0,0001$ ). Las heridas que recibieron GHRP-6 mostraron un menor nivel de infiltrado inflamatorio y un mayor grado de organización de su MEC, dado por una menor acumulación de fibrina y la presencia de hebras de colágeno más finas y distribuidas de forma horizontal. No se observaron diferencias en cuanto a la cantidad de vasos sanguíneos activos (Tabla 3).



**Tabla 3.** Impacto de la administración tópica de GHRP-6 sobre la inflamación y la fibroangiogénesis

	Células inflamatorias	Vasos sanguíneos activos	Reconstitución de la matriz dérmica
GHRP-6	7,86 ± 2,41*	8,34 ± 3,02	1,9 ± 0,36*
Vehículo	15,74 ± 3,91	8,38 ± 2,89	2,49 ± 0,38

**Figura 2.** GHRP-6 acelera el cierre de la herida. Las diferencias en el área de las lesiones aparecieron luego de las primeras 24 h de iniciado el tratamiento y se mantuvieron hasta el sacrificio de los animales, a las 96 h. ANOVA de dos vías (\* $p=0,016$ ; \*\*\* $p<0,001$ )

\* $p=0,001$ ; test *t* de Student, no pareado de dos colas

A nivel molecular, el GHRP-6 redujo la expresión transcripcional de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral ( $p=0,0306$ ), del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  ( $p=0,0171$ ) y del factor de crecimiento de tejido conectivo ( $p=0,001$ ). Estos efectos se tradujeron en la disminución de la expresión genes que codifican para proteínas de MEC y para proteínas marcadoras de miofibroblastos. Los resultados concernientes a este modelo aparecieron en la siguiente publicación internacional (anexa):

**Growth Hormone-Releasing Peptide 6 Enhances the Healing Process and Improves the Esthetic Outcome of the Wounds.** Mendoza Y, Fernández M, Aguilera A, García A, Bermúdez Y, Mir AJ, Berlanga J. *Plastic Surgery International*. Volume 2016, Article ID 4361702

**Demostración del efecto anti-fibrótico del GHRP-6 en el modelo de queloide en la cara interior de la oreja de conejo**

Se aplicó una formulación de GHRP-6 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en gel de carboximetilcelulosa (CMC) al 1% durante 30 días, en heridas controladas que se realizaron a ambos lados de la línea media de las orejas de conejos New Zealand machos. El efecto más notable de la intervención con el GHRP-6 fue la prevención de la aparición de la cicatriz hipertrófica. Como se muestra en la Tabla 4, el tratamiento con el péptido abortó el debut de los queloides en el 90,5% de las heridas tratadas. De forma contraria, el 87,5% de las heridas que recibieron la solución viscosa de CMC 1% evolucionaron hacia cicatriz hipertrófica, con una apariencia en forma de pezón, enrojecida y de consistencia firme al tacto (Figura 3).

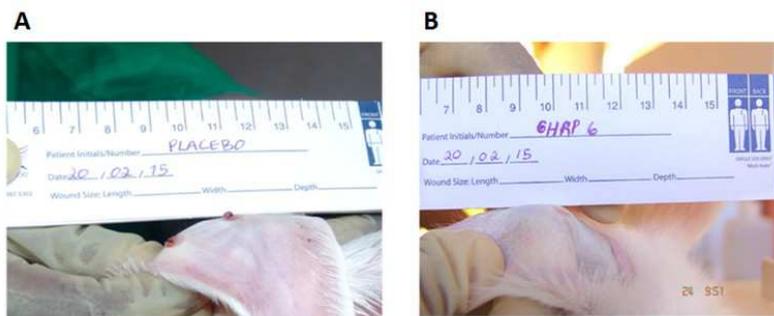
**Tabla 4** Efecto del GHRP-6 en la prevención de las cicatrices hipertróficas

Grupo	Número total de heridas	Fenotipo hipertrófico	Fenotipo normal	Índice de elevación de la cicatriz
GHRP-6	84	8 (9,5%)	76 (90,5%)	1,12 $\pm$ 0,11*
Vehículo	80	70 (87,5%)	10 (12,5%)	1,67 $\pm$ 0,15

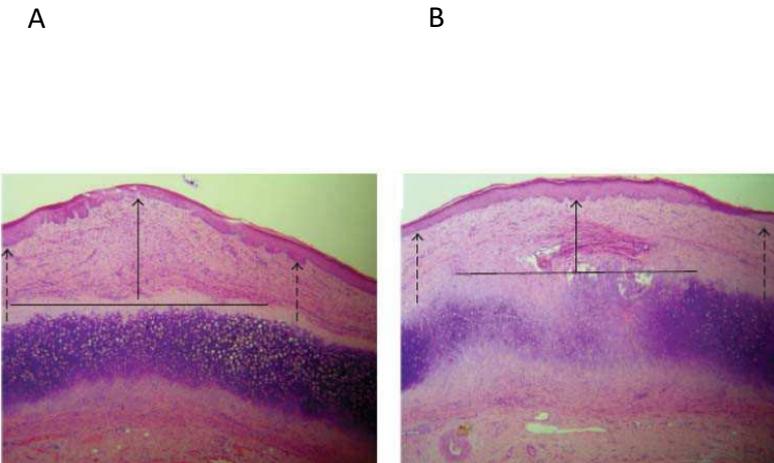
\* $p=0,001$  Prueba *t* de Student de dos colas, para datos no pareados

El péptido parece reducir primariamente la hiper celularidad local asociada las células del pericondrio del cartílago y la acumulación resultante de MEC (Figura 4). Consecuentemente,

su índice de elevación de la cicatriz ( $1,12 \pm 0,11$ ) fue significativamente menor ( $p=0,001$ ) al que se obtuvo para las heridas que recibieron vehículo ( $1,62 \pm 0,15$ ).



**Figura 3.** La aplicación tópica del GHRP-6 mejoró el aspecto macroscópico de las heridas. **A-** Representativo de las heridas que evolucionaron hacia cicatriz hipertrófica. **B-** imagen típica del efecto de la administración de GHRP-6.



**Figura 4.** Aspecto microscópico de las heridas en las orejas de conejos. **A-** Imagen representativa de las heridas tratadas con vehículo. **B-** Imagen representativa del efecto inducido por el tratamiento con GHRP-6.

A nivel molecular, el GHRP-6 redujo la expresión transcripcional del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  y del factor de crecimiento de tejido conectivo ( $p<0,05$ ) y aumentó la expresión del factor transcripcional PPARG ( $p=0,016$ ). Estos resultados también aparecen en la publicación internacional:

**Growth Hormone-Releasing Peptide 6 Enhances the Healing Process and Improves the Esthetic Outcome of the Wounds.** Mendoza Y, Fernández M, Aguilera A, García A, Bermúdez Y, Mir AJ, Berlanga J. *Plastic Surgery International*. Volume 2016, Article ID

4361702.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rosenbloom J, Castro SV, Jiménez SA. Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med.* 2010;152(3):159-66.
2. Kochanek KD, Murphy SL, Anderson RN, Scott C. Deaths: final data for 2002. *Natl Vital Stat Rep.* 2004;53(5):1-115.
3. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology.* 1984;114(5):1537-45.
4. Correa-Silva SR, Sa LB, Lengyel AM. [Ghrelin and growth hormone secretagogues (GHS): modulation of growth hormone secretion and therapeutic applications]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(5):726-33.
5. Cibrian D, Ajamieh H, Berlanga J, Leon OS, Alba JS, Kim MJ, et al. Use of growth-hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) for the prevention of multiple organ failure. *Clinical science.* 2006;110(5):563-73.
6. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res.* 2002;90(8):844-9.