

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CEREBROLISINA SOBRE LA PIGMENTACIÓN DE
CABELLO EN HUMANOS**

POR

DR. GUSTAVO VILLARREAL REYNA

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORADO EN MEDICINA

Enero, 2024

Director de Tesis Doctoral

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna

Profesor y Jefe del Departamento de Histología.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Co-Directora de Tesis Doctoral

Dra. Med. Minerva Gómez Flores

Profesora del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Miembros de la Comisión de Tesis Doctoral

Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas

Profesora del Departamento de Histología.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña

Profesor y Jefe del Departamento de Anatomía.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dr. Med. Alejandro Quiroga Garza

Profesor del Departamento de Anatomía.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Sustentante

Dr. Gustavo Villarreal Reyna

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CEREBROLISINA SOBRE LA PIGMENTACIÓN DE
CABELLO EN HUMANOS**

Aprobación de tesis:



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Director de Tesis Doctoral



Dra. Med. Minerva Gómez Flores
Co-Directora de Tesis Doctoral



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Comisión de tesis



Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña
Comisión de tesis



Dr. Med. Alejandro Quiroga Garza
Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mis amados hijos, Paulina, Camila, Gustavo Marcelo, Isabella, quienes fueron mi inspiración constante y mi razón para perseguir este doctorado en medicina. A mi esposa, Marcela, por su apoyo inquebrantable y amor incondicional en cada paso de este viaje.

A mis padres, María de los Ángeles, Eleazar, por su constante aliento y ejemplo de dedicación.

A mi maestro que en paz descanse, Dr. Med Román Garza-Mercado Jefe de Neurocirugía del Hospital Universitario durante el tiempo adecuado, por ser un ejemplo de fortaleza y superación constante, por sus enseñanzas a lo largo de mi formación como Neurocirujano.

Esta tesis es un reflejo de nuestro amor, apoyo y esfuerzo compartido. Gracias por ser mi fuente de fuerza y motivación. Este logro es de todos nosotros.

AGRADECIMIENTOS

En el proceso de desarrollar este protocolo de investigación para mi doctorado en Medicina, he recibido apoyo y orientación de muchas personas a quienes deseo expresar mi sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. Med. Roberto Montes de Oca Luna, por su experiencia, paciencia y compromiso en guiarme a lo largo de esta etapa crucial de mi carrera académica, sus consejos y conocimientos han sido invaluable, quién en colaboración y amistad con mis valiosos compañeros de investigación al Dr. Rodolfo Garza Morales, Dr. C. José Juan Pérez Trujillo, así como al Dr. C Adolfo Soto Domínguez que han enriquecido enormemente esta experiencia.

Nuevamente, agradezco a mi familia, por el esfuerzo permanente y comprensión durante este desafiante camino. También, a mis amigos y colegas que me han brindado su ánimo y motivación constantemente. No puedo pasar por alto el agradecimiento a los participantes de este estudio, cuya colaboración es esencial para el éxito de esta investigación.

Por último, agradezco a todas las fuentes de financiamiento que hicieron posible este proyecto. Este protocolo es el resultado del esfuerzo colectivo y el apoyo de muchos, y por eso estoy profundamente agradecido.

Espero que esta investigación contribuya de manera significativa al campo de la medicina y la salud.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES.....	14
Envejecimiento demográfico.....	14
Senescencia.....	16
Senescencia por envejecimiento.....	18
Pigmentación en piel.....	19
Pigmentación en folículo piloso.....	20
Encanecimiento asociado a la edad.....	22
Activación del melanosoma.....	22
Intervenciones para el encanecimiento.....	23
Cerebrolisina.....	24
Cerebrolisina como tratamiento neurológico.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	28
ORIGINALIDAD.....	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES.....	32
METODOLOGÍA.....	34
Tipo de estudio.....	34
Proceso de reclutamiento de pacientes.....	34
Declaración de ética.....	35
Esquema de terapia con Cerebrolisina para pacientes neurológicos.....	35
Valoración macroscópica de pigmentación del cuero cabelludo.....	36
Colecta de biopsias del cuero cabelludo.....	37
Análisis morfológico de biopsias del cuero cabelludo.....	37
Análisis estadístico.....	38
RESULTADOS.....	39

Reclutamiento de pacientes con encanecimiento severo.....	39
En el análisis macroscópico del cuero cabelludo se percibió una mejora en su aparición y pigmentación durante los ciclos de terapia con Cerebrolisina.....	40
La repigmentación del cuero cabelludo está asociado a la expresión del marcador melanosómico MART-1/Melan-A.....	48
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS.....	56
REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencias actuales y proyecciones del incremento en la esperanza de vida en distintas regiones del mundo.....	15
Figura 2. Incremento de la proporción del sector poblacional mayor de 65 años con respecto al sector de 15-64 años en México.....	16
Figura 3. La célula senescente como eje en los procesos inflamatorios para la progresión a enfermedades asociadas a la edad.....	18
Figura 4. Transferencia de melanosomas maduros de los melanocitos hacia los keratinocitos de piel.....	20
Figura 5. Participación del melanocito en las fases de crecimiento del folículo piloso.....	21
Figura 6. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#1) femenina de 77 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.....	41
Figura 7. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#2) femenina de 63 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.....	42
Figura 8. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#3) femenina de 72 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.....	43
Figura 9. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#4) masculino de 67 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.....	44
Figura 10. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#5) masculino de 74 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.....	45
Figura 11. Inmunodetección de la expresión de MART-1/Melan-A, marcador de melanocitos con síntesis de melanosomas, en distintas regiones del cuero cabelludo.	49
Figura 12. Patrón de expresión de MART-1/Melan-A en distintas regiones del folículo piloso.....	49
Figura 13. Análisis histopatológico por tinción con hematoxilina y eosina de las biopsias de cuero cabelludo.....	50
Figura 14. Histoquímica de Fontana-Masson para la detección de melanina en distintas regiones del cuero cabelludo.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Indicación terapéutica para el uso de Cerebrolisina y su valoración Glasgow.....	39
Tabla 2. Puntuaciones en la escala Hair Whitening Score (HWS) en los pacientes.....	47

LISTADO DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grado Celsius
cm ²	Centímetro cuadrado
g	Gramo
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μL	Microlitro

RESUMEN

Dr. Gustavo Villarreal Reyna.
Universidad de Nuevo León
Facultad de Medicina.

Fecha de titulación: Enero 2024

Título del estudio: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CEREBROLISINA SOBRE LA PIGMENTACIÓN DE CABELLO EN HUMANOS

Candidato para el grado de Doctorado en Medicina

Páginas en el estudio: 62

Área de estudio: Ciencias de la Salud, Neurología.

Propósito y Método del Estudio: El propósito del estudio fue describir a nivel molecular el efecto de la Cerebrolisina, preparado de neuropéptidos obtenidos por digestión enzimática, en la repigmentación del cuero cabelludo observada en pacientes de edad avanzada. El método de estudio fue reclutar pacientes de edad avanzada y con encanecimiento severo que acudan a terapia con Cerebrolisina por padecimientos neurológicos. El tratamiento consistió en 3 ciclos dando un total de 9 meses de seguimiento. Se realizó una valoración del avance de repigmentación del cabello de los pacientes durante el transcurso del tratamiento, así como se colectaron biopsias antes y al término del tratamiento para el análisis histopatológico, inmunohistoquímico, e histoquímico de la activación del melanosoma.

Resultados: En el cuero cabelludo de los pacientes se detectó una repigmentación tras cada ciclo de tratamiento, y este aumento culminó en la reducción de hasta 2 puntos acorde a la escala HWS en la valoración macroscópica. En el análisis histopatológico no se detectaron alteraciones en el cuero cabelludo, mientras que en el análisis inmunohistoquímico se detectó la expresión de MART-1/Melan-A, marcador melanosómico, en los melanocitos presentes en distintas regiones del folículo piloso; y por último, en el análisis histoquímico se detectó un aumento significativo de la presencia de depósitos de melanina en la raíz del folículo piloso en crecimiento.

Conclusiones y Contribuciones: La Cerebrolisina es capaz de inducir la repigmentación del cuero cabelludo de pacientes de edad avanzada que padecen de encanecimiento severo. La contribución del presente trabajo es, a nuestro conocimiento, esta es la primera evidencia que los neuropéptidos presentes en la Cerebrolisina son capaces de inducir la reactivación molecular del melanosoma mediada por MART-1/Melan-A para la síntesis y depósito de melanina. Por lo cual, este trabajo permite aumentar el conocimiento sobre la importancia de los preparados de péptidos de cadena corta, como la Cerebrolisina, y sus funciones pleiotrópicas en el organismo.



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director de Tesis

INTRODUCCIÓN

La Cerebrolisina es un fármaco que contiene una mezcla de neuropéptidos que son obtenidos a través de la proteólisis enzimática estandarizada de los purificados de proteínas de cerebros porcinos. Estos neuropéptidos poseen efectos neurotróficos y neuroprotectores que inducen la sobrevivencia y protección neuronal que se refleja en la mejora de las funciones cognitivas y funcionales del paciente. Su administración como fármaco data desde hace más de 40 años en distintos países de Europa y Asia como una terapia para pacientes que han sufrido accidentes cerebrovasculares, demencia, entre otros padecimientos neurodegenerativos. Este fármaco es utilizado por distintos grupos de edad, pero su uso suele ser mayor dentro de la población de la tercera edad ya que en ella se presenta una mayor incidencia de accidentes cerebrovasculares y padecimientos neurodegenerativos vinculados al envejecimiento.

La pérdida del pigmento capilar en el cuero cabelludo es un fenómeno común en el envejecimiento, donde la reducción del conteo total de melanocitos o la reducción de la capacidad funcional de los mismos provoca la reducción parcial o total de la síntesis de melanina en el folículo piloso conllevando al encanecimiento que da una apariencia grisácea a blanca del cabello. Los melanocitos son células que derivan de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, por lo cual comparten marcadores de células del sistema nervioso y podrían reaccionar ante el tratamiento con Cerebrolisina dando como resultado una reactivación en la pigmentación del cuero cabelludo.

El planteamiento del presente trabajo ocurrió por serendipia durante el tratamiento de una paciente de edad avanzada con encanecimiento severo y referida al tratamiento con Cerebrolisina por padecimiento neurológicos, que en el transcurso del año de terapia se detectó un aumento en el volumen y pigmentación en su cabello. Por el suceso anterior, y

en conjunto al conocimiento sobre el origen embrionario de los melanocitos y la formulación de la Cerebrolisina, se propuso el desarrollar una investigación en pacientes de edad avanzada con encanecimiento severo que cursen una terapia con Cerebrolisina y poder determinar si éste es capaz de inducir la activación de los melanocitos para la pigmentación del cuero cabelludo.

La importancia del presente trabajo radica en ser el primer reporte con evidencia molecular de la reactivación de la producción de melanina en el cuero cabelludo de pacientes de edad avanzada con encanecimiento severo en respuesta al tratamiento con Cerebrolisina, por lo cual, esto sugiere que los neuropéptidos de la formulación no solo previenen la progresión de enfermedades neurodegenerativas sino que son capaces de reactivar funciones en células senescentes.

ANTECEDENTES

Envejecimiento demográfico.

En los últimos reportes de censos poblacionales se ha registrado un estimado de 7.8 billones de habitantes en el mundo, y con un incremento de casi 100 millones por año. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en el año 2019 se registraron 703 millones de personas mayores a 65 años de edad, lo cual ha ido en aumento, siendo que en 1990 el 6% pertenecía a dicho sector, en 2019 representa un 9% y se estima que en el año 2050 aumente a más allá de un 16% de la población total. Las regiones con mayor población de personas ≥ 65 años se encuentran en Sureste de Asia, seguido por Europa y América, lugares en los cuales se espera un incremento que va del 50-200% de población para el año de 2050. ¹

Los avances en materia de tecnología y en salud han permitido un incremento significativo en la esperanza de vida de la humanidad de hasta 17 años respecto al año 1990 a 2019, respectivamente, de los cuales hasta 13.5 años son vividos con plena salud. Sin embargo, el aumento en la esperanza de vida trae consigo un aumento en la incidencia de enfermedades asociadas con la senescencia celular presentándose un aumento en enfermedades tales como cáncer, diabetes, neurodegeneración, infartos, entre otras, llevando a la necesidad de desarrollar terapias capaces de contrarrestar o aminorar los efectos de la senescencia celular. ²⁻⁴ Aunado a la problemática anterior, la población mundial está envejeciendo donde se espera que en un futuro exista un predominio de sociedades compuestas por población de edad avanzada debido a la reducción gradual de tasa de natalidad asociado a problemas de fertilidad y a las tendencias sociales. ⁵

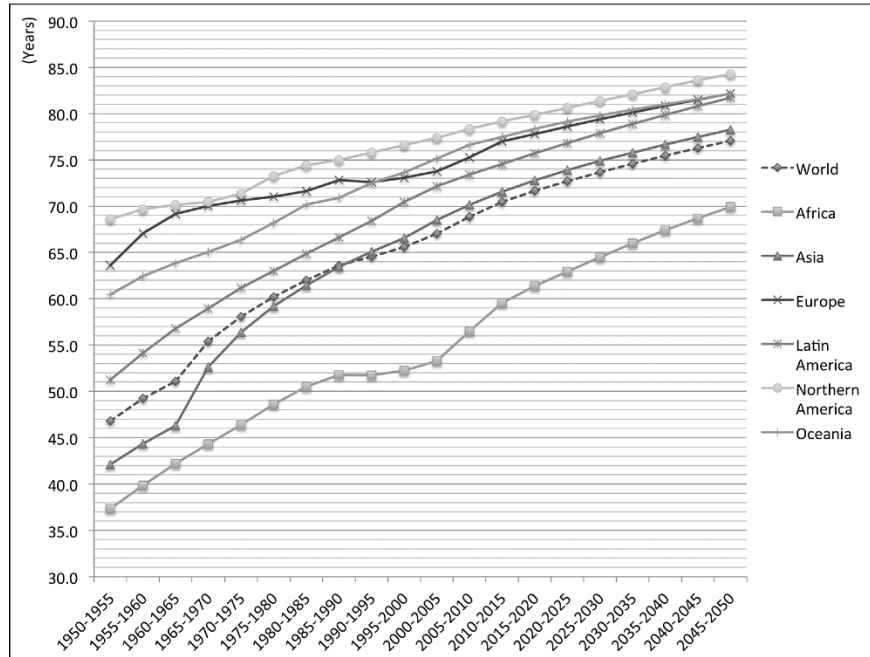


Figura 1. Tendencias actuales y proyecciones del incremento en la esperanza de vida en distintas regiones del mundo. En las proyecciones para el año 2050 se observa que la esperanza de vida media en algunas regiones será hasta más de 80 años. Imagen tomada de Nagao y colaboradores. ⁴

En México los estudios demográficos arrojan que en el año 2015 la mediana de la edad poblacional era 28 años pero se estima que será de 42 años para el año 2050, esto implica que el sector poblacional mayor a 65 años está en un crecimiento activo acompañado de una reducción en la tasa de natalidad.⁶ Por lo cual, México también presentará una creciente problemática por el aumento de casos de enfermedades asociadas al envejecimiento donde destacan en los primeros lugares las enfermedades de corazón, diabetes, cáncer, hepáticas, cardiovasculares y cerebrovasculares. ⁷ Por todo lo anterior, esto conlleva a la urgencia a la necesidad del desarrollo de estrategias terapéuticas que

reduzcan la aparición de enfermedades o que sean capaces de aminorar el cuadro clínico con la finalidad de mejorar la calidad de vida del paciente.

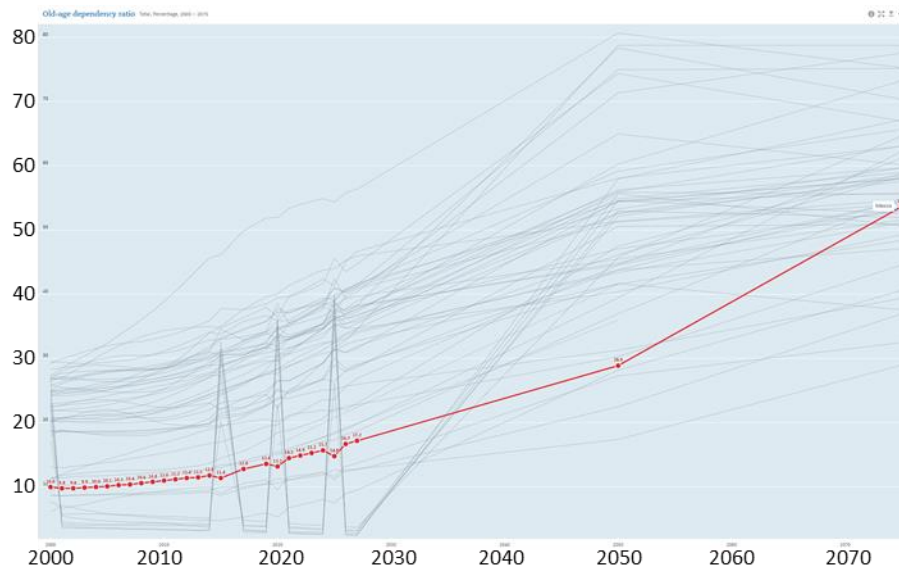


Figura 2. Incremento de la proporción del sector poblacional mayor de 65 años con respecto al sector de 15-64 años en México. Imagen tomada de Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE).⁸

Senescencia.

La senescencia se define como la respuesta de las células ante el envejecimiento cronológico. La célula al dividirse presenta una replicación de su ADN donde invariablemente presentará una pérdida gradual en sus telómeros en cada división celular, por lo que al llegar a una longitud telomérica crítica, la célula limitará o perderá su capacidad de mitosis y se activarán los mecanismos de senescencia. Esto comprende a la activación de mecanismos para la resistencia a la muerte celular por apoptosis, de tal manera que las células continúen en los tejidos realizando sus funciones, aunque usualmente están disminuidas aunado a que las células senescentes suelen presentar alteraciones en su

morfología dado por la acumulación de subproductos intracelulares no depurados y la alteración de sus organelos ⁹

Los inductores de la senescencia se pueden dividir en tres categorías: daños en el genoma asociados a la edad, respuestas celulares al daño y las consecuencias de las respuestas según el tipo celular.¹⁰ Independiente de la categoría, el proceso de senescencia genera células que no son capaces de cubrir las funciones necesarias para mantener la homeostasis tisular; por ende, esto aumenta la probabilidad de aparición de patologías asociadas. Recientemente se ha descrito que la edad para la aparición de las enfermedades asociadas a la senescencia celular en un individuo, podría estar asociada a la susceptibilidad genética al daño inflamatorio en las distintas células madre residentes en el tejido diana; por lo cual, existen estudios genéticos enfocados en generar modelos matemáticos para calcular los riesgos para el desarrollo de las enfermedades acorde al tipo celular senescente. ¹¹

Aunado a lo anterior, se ha descrito que los fibroblastos residentes en la matriz extracelular al entrar en senescencia generan células que presentan un perfil secretor pro-inflamatorio, tales como citocinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas. Dicho secretoma puede inducir estrés en el microambiente tisular, afectando la diferenciación de los distintos epitelios, y por lo tanto aumentando la probabilidad de una disfunción tisular. Esto implica, que no necesariamente la aparición de las enfermedades sea partiendo de células específicas al epitelio, sino que también las células senescentes vecinas son capaces de promover un daño tisular o acelerar el proceso de senescencia en órganos. ¹²⁻¹⁴

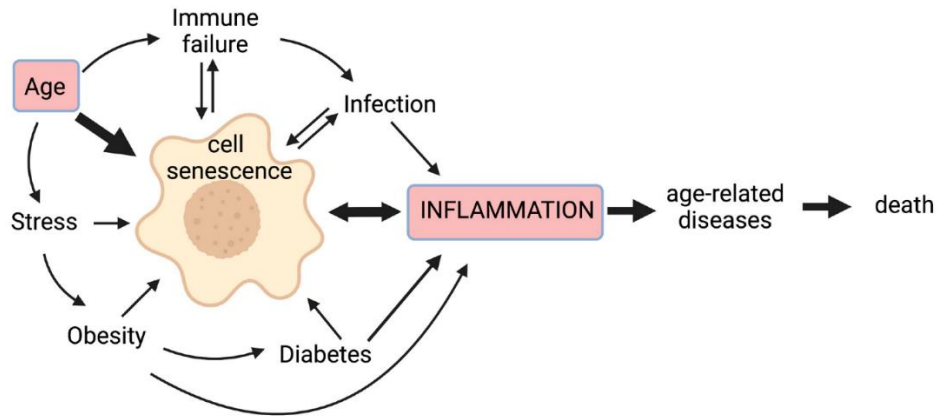


Figura 3. La célula senescente como eje en los procesos inflamatorios para la progresión a enfermedades asociadas a la edad. Imagen tomada de Cox y colaboradores.¹⁴

Senescencia por envejecimiento.

Entre las principales causas de la senescencia ligada por el envejecimiento están el acortamiento de los telómeros, la posible activación de oncogenes y la acumulación de organelos dañados, principalmente la mitocondria.⁹

Los telómeros son secuencias repetidas de ADN no codificante que se encuentran en los extremos de los cromosomas con la finalidad de proteger a las secuencias codificantes de rupturas durante el proceso de división celular; sin embargo, en cada división existen pérdidas de estos telómeros por lo que al alcanzar longitudes cortas existe una probabilidad de daño, así como las células suelen disminuir sus funciones mitóticas y metabólicas. Por lo cual, en individuos de edad avanzada es probable que exista un aumento en la incidencia de células que presenten senescencia vinculada al acortamiento de los telómeros.¹⁵

Los oncogenes derivan de alguna alteración (mutación, copias, funcionalidad) de secuencias involucradas en la división celular (protooncogenes); y es probable que estos

tengan la capacidad de promover la malignización celular y formación de tumores. Estos oncogenes pueden generarse de forma espontánea, sin embargo, el acumulamiento de especies reactivas de oxígeno y el acortamiento de telómeros por el envejecimiento son las principales causas. La senescencia mediada por los oncogenes aún se encuentra en estudio, esto se debe a que la célula entra en un estado de respuesta senescente, pero mantiene altas señalizaciones de mitosis y metabólicas, sin embargo, su funcionalidad es baja y presenta el riesgo de la formación de tumores. ¹⁶

Por último, la senescencia inducida por la acumulación de mitocondrias defectuosas está ligada al daño del ADN mitocondrial que ocurre durante la replicación, así como la acumulación de especies reactivas de oxígeno, conllevando así a la alteración de la generación de energía ATP y promoviendo un arresto celular ligado a la senescencia. ¹⁷

Pigmentación en piel

El factor principal para la tonalidad de la piel y cabello es el pigmento melanina, la cual se clasifica en eumelanina y feomelanina cuya diferencia radica en la acumulación de azufre en su estructura pasando de un color pardo a amarilla, respectivamente. La estructura química de la melanina permite que sea capaz de absorber la radiación UV y disipar los posibles daños que pudiese ocasionar en las células. El melanocito es la célula especializada en la producción de dichos pigmentos a través del proceso de melanogénesis. Tras la síntesis de la melanina, esta es acumulada en organelos membranosos llamados melanosomas, y posteriormente estos son transferidos a distintos tipos celulares con la finalidad de fungir como barrera protectora contra los posibles daños en el genoma inducidos por la radiación UV. El proceso de transferencia de los melanosomas es a través de exocitosis por los melanocitos y la fagocitosis por las células

circundantes, siendo los queratinocitos de la piel los principales en recibir dichas transferencias.^{18,19} Este proceso ocurre principalmente en los estratos inferiores de la piel (basal y espinoso), de tal manera que durante la formación de queratinocitos en el estrato basal, estos incorporan el melanosoma formando una estructura perinuclear con la finalidad de proteger al genoma de la radiación UV. Estos queratinocitos continuarán con su avance por el estrato granuloso, estrato córneo y eventualmente serán descamados de la piel; por lo tanto en la piel siempre será necesario la síntesis de melanosomas y su transferencia a los queratinocitos de reciente formación en el estrato basal²⁰

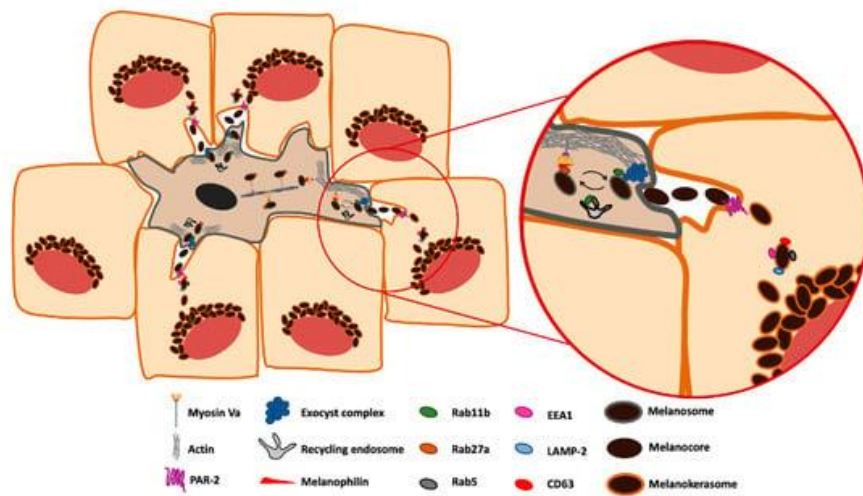


Figura 4. Transferencia de melanosomas maduros de los melanocitos hacia los queratinocitos de piel. En la amplificación se observa la exocitosis de los melanosomas por los melanocitos y la posterior internalización en los queratinocitos por un proceso similar a la fagocitosis.¹⁹

Pigmentación en folículo piloso.

El folículo piloso y las unidades de pigmento epidérmicas ocupan diferentes compartimientos cutáneos en la piel adulta y éstas derivan de células precursoras de la

cresta neural que se comprometen al linaje del melanocito en la región dorsal del tubo neural en el embrión y adicionalmente derivan de células de Schwann precursoras a través de una vía ventral. Estas células después migran para formar parte de la piel y en particular se posicionan en la capa basal de la epidermis. ¹⁸

Los melanocitos del bulbo del folículo piloso del cuero cabelludo están en su máxima actividad durante la juventud, cuando las unidades de pigmento epidérmicas solo tienen un par de ciclos de crecimiento y además es cuando responden más a los estímulos hormonales. La pérdida progresiva de la pigmentación de los tallos de los folículos pilosos, causada por una disminución del número y función de los melanocitos en la matriz del folículo da como resultado la formación de canas. El periodo más activo de pigmentación del cabello ocurre durante el crecimiento del mismo llamada fase anágena. En los folículos pilosos del cuero cabelludo humano, este periodo puede durar hasta 10 años, aunque lo más común es que la fase anágena del cuero cabelludo dure 3 años. Posteriormente, en la fase catágena existe un desacople de los melanocitos, por lo que se detiene la inyección de melanosomas dentro del folículo piloso; mientras que en la fase telógena la actividad del melanocito en el folículo piloso es nula. ²¹⁻²³

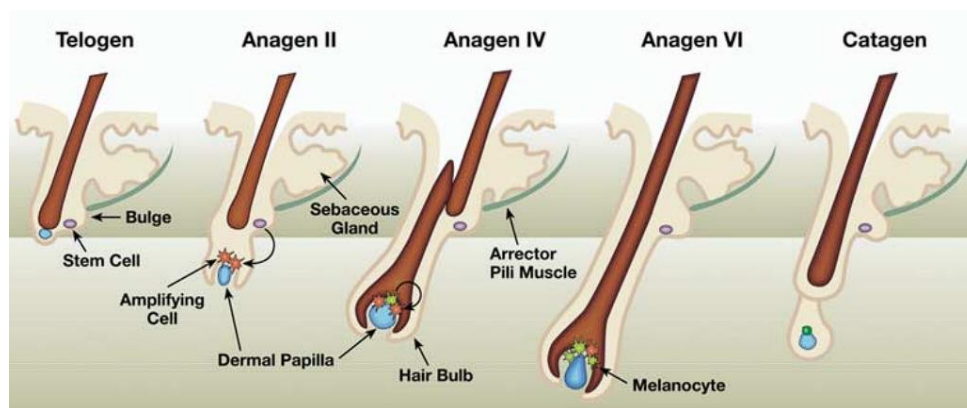


Figura 5. Participación del melanocito en las fases de crecimiento del folículo piloso.

Imagen tomada de Jenkins y colaboradores. ²³

Encanecimiento asociado a la edad.

El inicio y la progresión de encanecimiento se correlacionan con el envejecimiento cronológico y ocurre de manera diferente en todos los individuos, sin importar el género y etnia. El inicio del encanecimiento es de carácter hereditario y controlado genéticamente. El encanecimiento prematuro ocurre aproximadamente antes de los 20 años en la población caucásica, antes de los 25 años de edad en la población asiática y antes de los 30 años en personas de ascendencia africana ²⁴

La senescencia reduce las actividades funcionales de las células, por lo que los melanocitos presentes en los folículos pilosos suelen reducir sus actividades de síntesis y secreción del melanosoma. Sin embargo, otro de los factores que se ha relacionado con el encanecimiento fisiológico o cronológico son cambios cualitativos y cuantitativos de células madre, en particular se ha determinado que la pérdida de células madres CD200+ de los folículos pilosos ocasiona una despigmentación prematura en humanos. ^{22,25} Estas células madres residen en un nicho muy bien delimitado dentro del folículo piloso, mientras que los melanocitos diferenciados residen en el bulbo del folículo piloso. ²⁶

Activación del melanosoma.

La formación del melanosoma es iniciada por la estimulación del receptor transmembranal MC1R (receptor de melanocortina-1) presente en la membrana plasmática del melanocito, el cual a través de los segundos mensajeros de AMPc y MITF (factor de transcripción microftálmico) induce la síntesis de las enzimas necesarias para la maduración del melanosoma. El melanosoma inicia como una vesícula de vía secretora que acumula compuestos melánicos, y este continua por distintas etapas de maduración en donde las enzimas Tirosinasas Tyrp1 y Tyrp2 provocan la conversión progresiva de la eumelanina,

por lo cual en análisis histopatológicos en microscopía electrónica de transmisión es posible distinguir el grado de maduración de cada melanosoma acorde al aumento de la intensidad del color pardo .²⁷

Existen casos en donde hay una alteración en los genes involucrados en la activación de melanogénesis, esto conlleva a que todas las estirpes de melanocitos presenten una reducción en el número de melanosomas, cambios en su estructura y/o función, lo que conlleva a un padecimiento denominado albinismo. Por esta razón, los individuos afectados presentan una coloración pálida de piel, cabello blanco y problemas oculares debido a la disfunción del epitelio pigmentario de la retina. ²⁸

El marcador MART-1/Melan-A es una proteína que se encuentra expresada estrictamente en células productoras de melanina, ya sean células normales o células transformadas. En estudios de fraccionamiento celular se detectó que la proteína MART-1/Melan-A se encuentra en la membrana de vesículas con contenidos melánicos, así como de vesículas de la red trans-Golgi, sugiriendo que la expresión de esta proteína está vinculada desde etapas tempranas en la formación de las vesículas destinadas a los melanosomas y permitiría el rastreo de células en vías de la melanogénesis. ^{29,30}

Intervenciones para el encanecimiento.

La primera opción no farmacológica es el uso de colorantes artificiales para el cabello. Estos colorantes temporales consisten de estructuras orgánicas complejas, las cuales no penetran a la cutícula, pero que son capaces de cubrir las canas. Los colorantes permanentes son los más utilizados, y su función radica en la formación de moléculas de color ocurre dentro del folículo piloso en donde queda fijado. La ventaja de estos colorantes es que persisten por mucho tiempo incluso después de lavar el cabello, sin embargo,

conforme crece el cabello comienza a percibirse que el nuevo segmento formado no presenta coloración por lo que es necesario reaplicar el colorante cada periodo de tiempo. Estos colorantes son considerados seguros, sin embargo, debido a los componentes de los tintes es posible que en algunas personas se desarrollen dermatitis alérgicas; así también existen reportes donde hipotetizan que su uso constante puede participar en el desarrollo de cáncer de piel. ³¹

Actualmente no hay un tratamiento farmacológico fiable para revertir el proceso de encanecimiento. Solamente se ha reportado el uso del ácido p-aminobenzoico capaz de inducir una repigmentación parcial, sin embargo, este efecto solamente fue observado durante el periodo de tratamiento y el problema de encanecimiento reincidió al mes de terminarlo, aunado a que los pacientes reportaron dolores gastrointestinales, por lo que no se recomienda el uso de PABA con fines de terapia contra el encanecimiento. Por lo anterior, las terapias contra el encanecimiento están enfocadas en ser preventivas o de postergar su aparición a través del consumo de antioxidantes con el fin de prevenir la senescencia celular y daños en el proceso de pigmentación. ^{32,24}

Cerebrolisina

La Cerebrolisina es una preparación de neuropéptidos obtenidos a través de la proteólisis enzimática de un purificado de proteínas totales obtenidas de cerebros de porcino de registros sanitarios controlados. Los componentes presentes en su formulación poseen favorables efectos neurotróficos y neuroprotectores sobre la sobrevivencia neuronal en ensayos in vitro de cultivos primarios de modelos murinos^{33,34}. Por lo cual, este preparado es prescrito como un tratamiento intravenoso para condiciones neurológicas tales como

lesiones por accidentes cerebrovasculares, isquemia, demencia, traumatismos, entre otros, mostrando un mantenimiento o progresión del rendimiento cognitivo y funcional.^{35,36}

La Cerebrolisina ha sido distribuida y administrada en Europa y Asia desde hace más de 40 años, y esto gracias a los efectos neurotróficos y neuroprotectores que se han observado en pacientes neurológicos, y además que cuenta con certificados de perfil de seguridad y eficacia. En el año 2005 fue autorizado su uso en México por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la renovación de este registro (526M2005 SSA) se llevó a cabo en el año 2011. En México se comercializa con el nombre de Renacenz.³⁷

Los efectos secundarios por tratamiento con Renacenz son raros (<1/10,000 pacientes) en los cuales se incluyen trastornos del sistema inmune (Hipersensibilidad o reacciones alérgicas como picazón por reacciones en la piel, reacciones inflamatorias locales, cefaleas, dolor de cuello, dolor de extremidades, fiebre, dolor de espalda baja, disnea, escalofríos y estado tipo shock), mareo o desorientación aguda (por infusión intravenosa rápida), casos aislados de convulsiones, trastornos cardíacos (palpitaciones o arritmias), trastornos gastrointestinales (dispepsia, diarrea, constipación, vómito y náusea), y molestias locales en la zona de administración (eritema y quemazón).³⁸

Cerebrolisina como tratamiento neurológico.

La Cerebrolisina está constituida por un 25% de péptidos de bajo peso molecular (<10 kDa), y que tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica e inducir efectos similares a los factores de crecimiento neuronal. El 75% restante está constituido por aminoácidos, magnesio, potasio, fósforo y selenio, entre otros.³⁹

La cerebrolisina muestra una actividad neuroprotectora y una función neurotrófica lo cual aumenta la supervivencia de neuronas tras diferentes tipos de lesiones in vitro y en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. El mecanismo de acción se basa en la modulación de cuatro procesos neurobiológicos: neurotroficidad, neuroprotección, neuroplasticidad y neurogénesis ⁴⁰⁻⁴²

Esta preparación de péptidos ejerce efectos benéficos en enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer, demencia, accidente cerebrovascular, secuelas de traumatismo craneoencefálico y mejora la memoria en pacientes con deterioro cognitivo leve a moderado. En modelos de accidente cerebrovascular isquémico y de traumatismo craneoencefálico hay indicaciones que la cerebrolisina es capaz de prevenir el daño neuronal al prevenir la muerte celular, la formación de radicales libres y la inflamación, además de contrarrestar la citotoxicidad y acelerar la recuperación de la función neurológica. ^{36,43-45}

No existen reportes en la literatura con relación al impacto de la cerebrolisina sobre el folículo piloso y en particular sobre los melanocitos. Sin embargo, a la cerebrolisina se le ha determinado que posee propiedades de factores neurotróficos. Recientemente se han obtenido evidencias que los factores neurotróficos son componentes esenciales para el microambiente de las células madre. ^{40,41}

Un ejemplo de esto es el receptor para factores neurotróficos RET, el cual es expresado por células madre y su activación por dichos factores, impulsa su supervivencia, expansión y función ⁴⁶, cabe señalar que los melanocitos se derivan de células madre presentes en el folículo piloso. Más específicamente se ha reportado que la activación del receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) es crucial para la regulación de la apoptosis de la vaina radicular externa del folículo piloso en el cual se encuentra un nicho de células madre.⁴⁷ Todo lo

anterior representan evidencias y relaciones entre factores neurotróficos, células madre y folículos pilosos.

JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento cronológico provoca la pérdida de funciones celulares conllevando a disfunciones en el organismo. En las proyecciones demográficas se ha determinado que en el año 2050 existirá un incremento considerable en la proporción de adultos mayores con respecto a jóvenes, por lo cual, esto conlleva al riesgo de un aumento en la incidencia de enfermedades asociadas a la edad.

La Cerebrolisina es un medicamento de neuropéptidos obtenidos a partir de la proteólisis de proteínas de cerebro porcino que ha sido utilizado como tratamiento de lesiones en tejido nervioso gracias a sus funciones neurotróficas y neuroprotectoras. Por su formulación, es posible que esta mezcla de distintos neuropéptidos sea capaz de estimular a múltiples nichos celulares incluso a reservorios de células madre.

Los melanocitos son las células encargadas de la pigmentación folicular, sin embargo, en el envejecimiento suelen disminuir su funcionalidad y originan un encanecimiento. Estas células derivan de la cresta neural durante la embriogénesis, por lo que se hipotetiza que los distintos neuropéptidos de la Cerebrolisina puedan estimular la reactivación de síntesis y secretora de melanocitos y dar como resultado la repigmentación capilar.

El presente trabajo consistió en determinar si la Cerebrolisina es capaz de promover la activación de melanocitos en pacientes de edad avanzada con encanecimiento severo, esto como escenario de activación de células que han perdido su funcionalidad debido a la senescencia ligada al envejecimiento.

ORIGINALIDAD

La Cerebrolisina ha sido ampliamente utilizada como terapia de recuperación y mantenimiento en casos de padecimientos neurológicos, principalmente aquellos en donde ocurrió una lesión aguda. Este medicamento cuenta con un historial de uso desde hace 40 años en Europa, y ha presentado excelentes resultados terapéuticos en los pacientes; sin embargo, los resultados se enfocan en la recuperación nerviosa y no se ha explorado el efecto de este medicamento en nichos celulares menores; tales como los melanocitos quienes también parten de un origen neural.

La originalidad del presente trabajo radica en que nos enfocamos en describir un efecto no reportado hasta la fecha para la Cerebrolisina, en donde este efecto es benéfico para el paciente debido a la reactivación celular y nos conlleva a proponer el estudio de la Cerebrolisina como terapia para otros padecimientos asociados al envejecimiento. De esta manera se está generando conocimiento sobre terapias adyuvantes que puedan prevenir o minimizar la progresión de enfermedades asociadas a la edad.

HIPÓTESIS

Alternativa: La Cerebrolisina es capaz de inducir la activación de melanogénesis y melanocitos en folículos pilosos y piel de la cabeza.

Nula: La Cerebrolisina no es capaz de inducir la activación de melanogénesis y melanocitos en folículos pilosos y piel de la cabeza.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si la Cerebrolisina induce la melanogénesis y activación de melanocitos en folículos pilosos y piel del cuero cabelludo.

Objetivos particulares

- Analizar macroscópicamente el efecto de la Cerebrolisina sobre la pigmentación del cabello y piel del cuero cabelludo.
- Determinar si la Cerebrolisina induce la activación de melanocitos en folículos pilosos del cuero cabelludo.
- Determinar si la Cerebrolisina induce la melanogénesis en folículos pilosos del cuero cabelludo.

MATERIALES

Reactivos

- Formalina tamponada (CTR)
- Etanol absoluto (CTR)
- Xilol (CTR)
- Parafina (CTR)
- Hematoxilina (Sigma-Adrich)
- Eosina (Sigma-Adrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Fontana Masson (Sigma Aldrich)
- Anticuerpo MART-1/Melan-A (Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo secundario anti-murino marcado con peroxidasa (VivoBio Biotechnology)
- Diaminobencidina (Vector)

Soluciones

- PBS 1X: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄.
- TBS 1X: 50 mM Tris-Cl, pH 7.5. 150 mM NaCl.
- TBS-Tween: TBS1X + 0.05% Tween
- Buffer de citratos: 0.5M C₆H₅Na₃O ajustado a pH 6.0
- Suero de caballo al 5%: Inactivado por calor a 56°C / 30 min y dilución en PBS1x.
- Formalina al 10% preparada en PBS 1X

Equipo de laboratorio

- Balanza Analítica (GR-120, AND)
- Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)
- Micropipetas 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l y 10 μ l (Labnet)
- Refrigerador 4/-20°C (Samsung)
- Histoquinete (Kedee)
- Centro de inclusión (Kedee)
- Micrótopo para bloques de parafina (RM2245, Leica)
- Microscopio de campo claro (DM500, Leica) con cámara (5.0 RTV, Micropublisher)

METODOLOGÍA

Tipo de estudio.

Prospectivo, longitudinal, experimental, comparativo: Estudio Piloto

Proceso de reclutamiento de pacientes.

Los pacientes reclutados para el presente estudio fueron aquellos referidos al tratamiento con Cerebrolisina prescrito por el neurólogo para el mantenimiento o reparación del tejido neuronal y que además presentasen un padecimiento de encanecimiento severo. El reclutamiento fue en el Servicio de Neurocirugía de Doctors Hospital Monterrey durante el periodo del 2015 al 2016. El estudio fue un estudio piloto del tipo retrospectivo, longitudinal, experimental, y comparativo. Se reclutaron a pacientes mayores de 40 años y que cumplieran con todos los siguientes criterios de inclusión: (1) prescripción por un neurólogo para el tratamiento con Cerebrolisina como terapia de mantenimiento debido a un accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, lesión cerebral traumática o demencia, y (2) padecer de un encanecimiento severo vinculado con la edad. Los criterios de exclusión del estudio fueron los siguientes: ser menor de 18 años de edad, en condición de embarazo, con antecedentes de uso de productos para repigmentar el cabello, contar con antecedentes de Insuficiencia Renal Severa, Crisis convulsivas, Epilepsia mal controlada e Hipersensibilidad a algunos componentes de la cerebrolisina, enfermedades o condiciones que ocasionen hiperpigmentación como la enfermedad de Addison, o que presentasen características psicóticas como confusión, agitación o problemas del comportamiento dentro de los últimos tres meses previo al inicio del estudio. Los criterios para la eliminación de la participación de un paciente en el estudio fue la falta de adherencia a la terapia o al

cumplimiento de alguno de los criterios de exclusión, previamente mencionados, durante el estudio.

Declaración de ética.

A cada paciente se le solicitó el consentimiento informado por escrito para la colecta de 2 biopsias de cuero cabelludo: una previa al inicio de tratamiento y otra al término del último ciclo de tratamiento. También se solicitó el permiso para la captura y publicación de fotografías macroscópicas de su cuero cabelludo, las cuales fueron procesadas para mantener el anonimato del participante. Al paciente se le informó que el presente estudio empleó dosis del protocolo estándar de Cerebrolisina y que en ningún momento fue un ensayo clínico para ajuste o búsqueda de dosis con fines repigmentativos. El estudio cumplió con los lineamientos de la Declaración de Helsinki, además de haber sido sometido y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Folio: NC15-001). Toda la información del reclutamiento, objetivos y condiciones del estudio también fueron registradas y divulgadas en la plataforma internacional de ClinicalTrials.gov para su libre acceso (Folio: NCT05288465).

Esquema de terapia con Cerebrolisina para pacientes neurológicos.

El protocolo estándar para la terapia con Cerebrolisina con afecciones neurológicas es la administración por infusión intravenosa (iv) de 5 viales por semana, 2 viales administrados los lunes y 3 viales los jueves, durante 4 semanas; seguido de un período de descanso de 8 semanas; esto se clasifica como un ciclo de tratamiento. El anterior protocolo permite reducir el número de intervenciones en los pacientes, fomentar la asistencia a todas las

citas para la terapia, y mantenerse en los rangos de dosis recomendadas descritos para la Cerebrolisina. Los pacientes recibieron 3 ciclos de tratamiento dando un total de 9 meses de seguimiento. Cada infusión intravenosa se preparó de la siguiente manera: cada vial de 10 mL que contenía 215.2 mg/mL de Cerebrolysin (EVER Pharma, Austria) se diluyó con solución salina fisiológica (NaCl al 0.9 %) hasta un volumen final de 100 mL. La duración de la infusión fue de aproximadamente 60 minutos, y todas las sesiones fueron en el Hospital bajo el mismo horario. Todos los pacientes fueron evaluados bajo la escala Glasgow para determinar el estado neurológico de alerta del paciente. Todo proceso en pacientes cumplió con los protocolos de Buenas Prácticas Clínicas.

Valoración macroscópica de pigmentación del cuero cabelludo.

Para valorar el cambio de la pigmentación en el cuero cabelludo se utilizó la puntuación de HWS (Hair Whitening Score) empleada por Kocaman y colaboradores. La puntuación se basa en la valoración macroscópica del avance de encanecimiento acorde a la proporción entre el cabello pigmentado y el no pigmentado, y se asignan los siguientes valores: 1 para cabello oscuro (folículos pigmentados 100-90%), 2 para oscuro > claro (folículos pigmentados 90-60%), 3 para oscuro = claro (folículos pigmentados 60-40%), 4 para claro > oscuro (folículos pigmentados 40-10%), y 5 para cabello claro (folículos pigmentados 10-0%). La evaluación y puntuación se realizó en cada cita, así como se colectaron fotografías macroscópicas del cuero cabelludo en los distintos ciclos de tratamiento con Cerebrolisina.

Colecta de biopsias del cuero cabelludo.

En el estudio se colectaron dos biopsias de cada paciente: una biopsia inicial en la zona de canicie del cuero cabelludo antes de iniciar el primer ciclo de tratamiento y otra al terminar los 3 ciclos de tratamiento en la zona de repigmentación del cuero cabelludo. Para la biopsia se realizó una asepsia del área usando clorhexidina, y el procedimiento se realizó bajo anestesia local usando lidocaína al 2% y epinefrina. Se utilizó biopsia en sacabocados de 4 mm y se suturó la herida con puntos no reabsorbibles con Prolene 4-0, los cuales se retiraron en el hospital a los 10 días post-colecta.

Análisis morfológico de biopsias del cuero cabelludo.

Las biopsias fueron fijadas en 20 mL de formol al 10% por espacio de 48 h, y posteriormente fueron deshidratadas por alcoholes ascendentes en el histoquinete, seguido de su inclusión final en parafina, y la obtención de cortes histológicos con un grosor de 4 μ m para el análisis histopatológico, histoquímico e inmunohistoquímico. Para la captura de todas las imágenes digitales en alta resolución se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 50i con un sistema de análisis de imágenes en el software NIS-elements (Digital Sight dDS-2Mu).

Para el análisis histopatológico, las laminillas fueron procesadas para la tinción de rutina con hematoxilina y eosina y su montaje en entellan. Cada muestra se realizó por duplicado y se evaluó las características morfológicas de los distintos componentes celulares y de matriz extracelular presentes en cuero cabelludo.

Para el análisis inmunohistoquímico, las laminillas fueron rehidratadas en soluciones de etanol en concentración descendente y terminando en agua desionizada. Las laminillas se incubaron en una solución tampón de citrato pH 6,0 para la recuperación de antígenos y los potenciales sitios de unión inespecífica fueron bloqueados usando una solución de suero

de caballo al 5% inactivado durante 30 min a 37 °C. El marcaje se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón contra Melan-A (Cat#A103, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:50 durante 12h a 4°C, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (VitroVivo Biotechnology) durante 2h a 37°C. Como controles negativos se utilizaron laminillas sin incubación con anticuerpo primario. Finalmente, las laminillas fueron incubadas con diaminobencidina, el cual funge como sustrato para la enzima peroxidasa y que es catabolizado en un producto insoluble de color marrón que se deposita en el tejido. Las muestras se evaluaron mediante microscopía de campo claro, y se analizó la positividad de entre las muestras antes y después del tratamiento en cada paciente bajo un objetivo de 10x y 40x.

Para el análisis histoquímico, las laminillas fueron procesadas mediante la técnica de Fontana-Masson para la detección de melanina. El fundamento de la técnica radica en la capacidad de la melanina en reducir al nitrato de plata en plata elemental, por lo cual, en los sitios donde exista acumulación de melanina se presentará un precipitado de plata dando una impregnación del tejido en color negro. Se eligieron ocho campos aleatorios bajo un objetivo de alta potencia (40x) por paciente antes y después del tratamiento. Las fotografías fueron utilizadas para cuantificar la positividad de melanina mediante el análisis por densitometría de señal utilizando el software Image J versión 1.51 (National Institutes of Health).

Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos morfométricos, los resultados se analizaron estadísticamente con GraphPad Prism 8.0 utilizando la prueba t-Student; un valor de $p \leq 0.01$ fue significativo.

RESULTADOS

Reclutamiento de pacientes con envejecimiento severo.

En el estudio se reclutaron 5 pacientes en total, 3 mujeres y 2 hombres, con una media de edad de 70.6 años y un rango que va de los 63 a 77 años. Estos pacientes reclutados presentan una lesión neurológica, razón por la cual el neurólogo les indicó la terapia con Cerebrolisina, y que además presentan un problema de envejecimiento severo. En la Tabla 1 se presenta la información de sexo, edad e indicación terapéutica de los pacientes reclutados; así también se incorporan los resultados de la valoración neurológica del estado de alerta de la persona usando la escala Glasgow.

Tabla 1. Indicación terapéutica para el uso de Cerebrolisina y su valoración Glasgow.

# Paciente	Sexo/Edad	Indicación terapéutica	Índice Glasgow pre- tratamiento	Índice Glasgow post- tratamiento
1	F / 77	Infarto isquémico y demencia vascular	Glasgow score 14	Glasgow score 15
2	F / 63	Infarto hemorrágico debido a aneurisma AcoA	Glasgow score 15	Glasgow score 15
3	F / 72	Infarto isquémico hemorrágico	Glasgow score 10	Glasgow score 10
4	M / 67	Infarto isquémico parietal	Glasgow score 14	Glasgow score 15
5	M / 74	Demencia	Glasgow score 15	Glasgow score 15

En el análisis macroscópico del cuero cabelludo se percibió una mejora en su apariencia y pigmentación durante los ciclos de terapia con Cerebrolisina.

En cada paciente reclutado se realizó una valoración macroscópica por escala HWS del grado de pigmentación de su cuero cabelludo antes de iniciar el tratamiento, así como una colecta de biopsia tipo punch que será utilizada como control basal del estado del cuero cabelludo. Posteriormente, se administró el ciclo de tratamiento de 5 viales distribuidos 2 en el día lunes y 3 para el jueves por 4 semanas; esto fue con la finalidad de facilitar la permanencia del paciente al tratamiento y evitar escenarios de abandono por las citas recurrentes; y posteriormente se dio 8 semanas como período de descanso antes de iniciar un nuevo ciclo. En cada visita se realizaron valoraciones macroscópicas por HWS del cuero cabelludo y se fotodocumentaron. Se realizaron 3 ciclos de tratamiento, dando total de 9 meses de seguimiento. Al término del período de descanso del tercer ciclo, los pacientes acudieron a consulta para la valoración final y toma de una segunda biopsia para los análisis histopatológicos.

A continuación, se presentan las imágenes del seguimiento de la valoración macroscópica para cada paciente (Figura 6-10). En los incisos a) se presenta la fotografía de la primera visita previo a tratamiento donde se muestra el área más afectada del cuero cabelludo. En los incisos b), c) y d) corresponde a la fotografía tomada al término del período de descanso del primer, segundo y tercer ciclo, respectivamente.

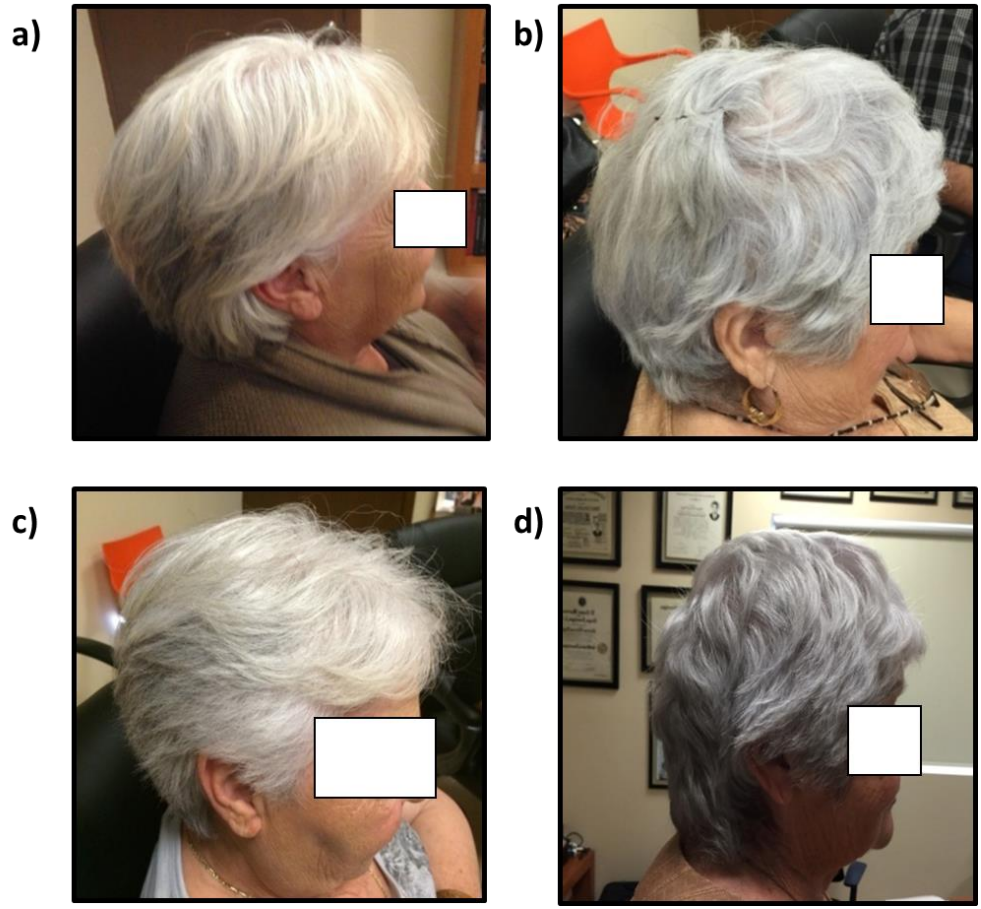


Figura 6. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#1) femenina de 77 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.

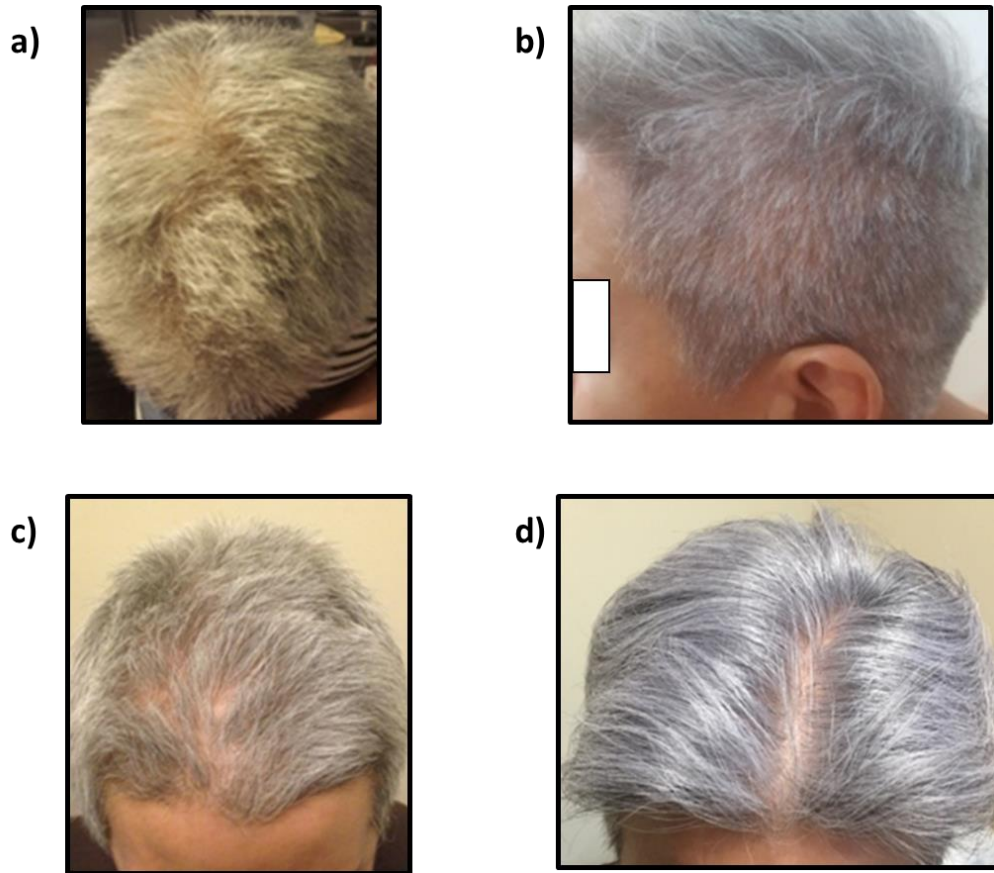


Figura 7. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#2) femenina de 63 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.

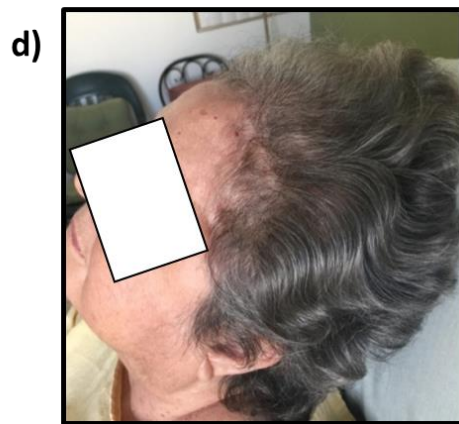
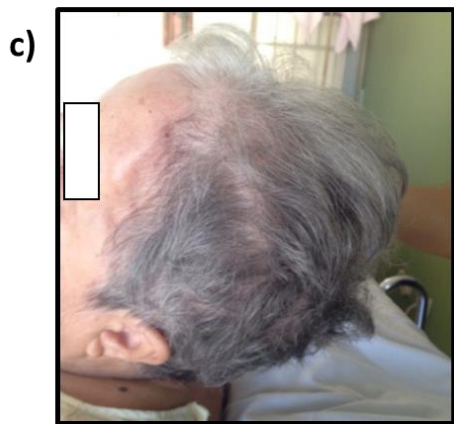
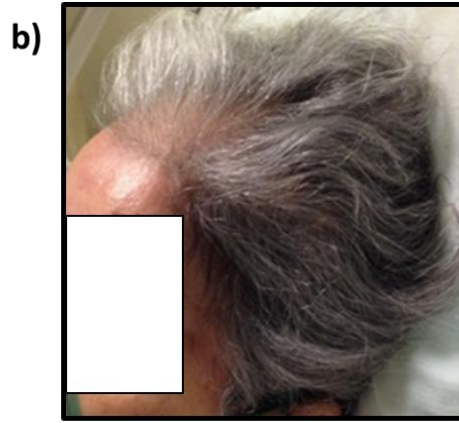


Figura 8. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#3) femenina de 72 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.

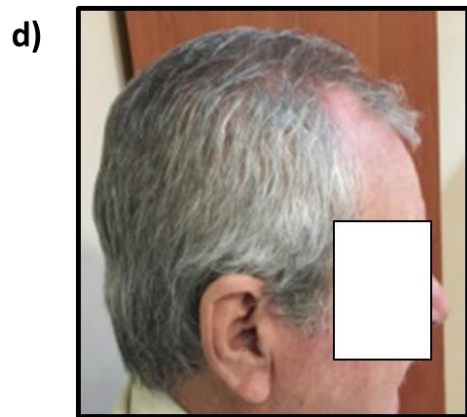
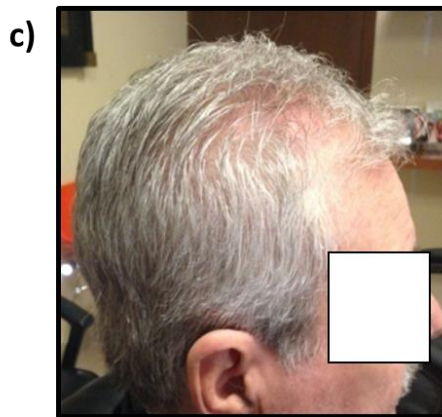
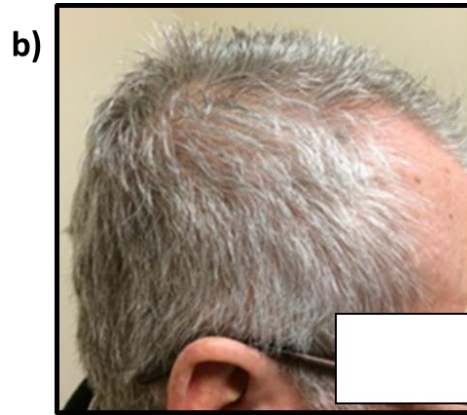


Figura 9. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#4) masculino de 67 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.

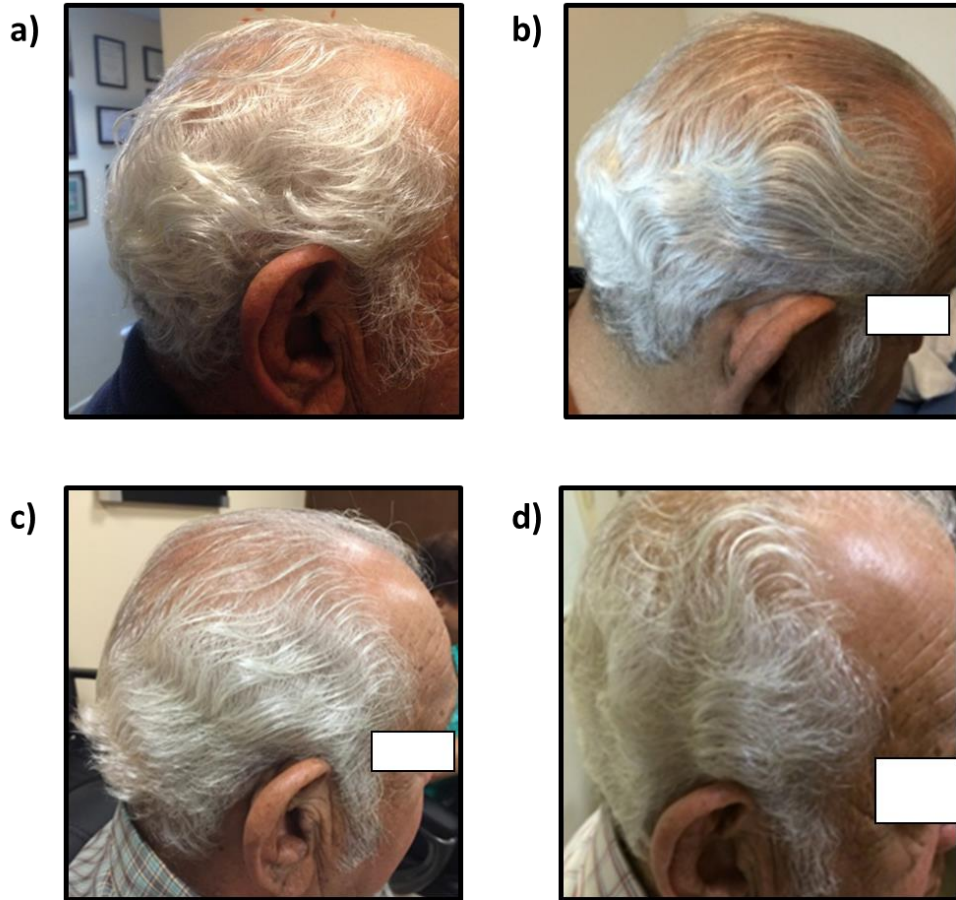


Figura 10. Progresión de pigmentación del cuero cabelludo de paciente (#5) masculino de 74 años durante el tratamiento con Cerebrolisina.

En las Figuras 6-10 se observa que conforme avanzan los ciclos de tratamiento con Cerebrolisina, se presenta un aumento en la cantidad de folículos pilosos que presentan una mayor pigmentación, y por consiguiente dan una mejora en la apariencia de pigmentación del cuero cabelludo. En todos los pacientes observamos que existe al menos un valor de diferencia en la escala HWS, en donde observamos que los pacientes iniciaron en un valor 4 en donde existe una mayor proporción de folículos no pigmentados, y llegaron a presentar un valor de 3 donde existe una proporción similar entre folículos pigmentados y no pigmentados. En el caso de la paciente #3 (Figura 8), se observó que fue quien presentó el cambio más drástico donde pasó a tener un valor final de 2 implicando que existe mayor cantidad de folículos pigmentados que no pigmentados, aunado a que en esta paciente se observa que el cabello presenta una mejor apariencia estética, humectación e incluso la paciente describió presentar un mejor crecimiento denotado por longitud alcanzada en ese periodo de tiempo.

Es necesario mencionar que los anteriores resultados fueron valorando la pigmentación macroscópica haciendo énfasis en las raíces y secciones basales de los folículos pilosos, esto es, el proceso de pigmentación ocurre desde la raíz y con el crecimiento de las fibras de cabello se va denotando esta pigmentación. Por lo anterior, la existencia de puntas blancas en los cabellos largos no implica un fracaso en la pigmentación, sino que es la porción residual de ese cabello; y se hipotetiza que la raíz de ese cabello en fase de incorporación de melanina continuaría pigmentándose y creciendo en longitud.

En la Tabla 2 se presentan el resumen de los resultados de los valores HWS obtenidos en la primera valoración previo a tratamiento, y al término del periodo de descanso del tercer ciclo con Cerebrolisina (noveno mes).

Tabla 2. Puntuaciones en la escala Hair Whitening Score (HWS) en los pacientes.

# Paciente	Sexo/ Edad	Hair Whitening Score (HWS) pre-tratamiento	Hair Whitening Score (HWS) post-tratamiento
1	F / 77	4	3
2	F / 63	4	3
3	F / 72	4	2
4	M / 67	4	3
5	M / 74	4	3

La repigmentación del cuero cabelludo está asociado a la expresión del marcador melanosómico MART-1/Melan-A.

Las biopsias fueron procesadas bajo la técnica histológica de rutina con inclusión en parafina. En los cortes histológicos se realizó una inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón específico contra la proteína MART-1/ Melan-A humana, seguido de una incubación con anticuerpo secundario anti-murino marcado con peroxidasa y finalmente su revelado por colorimetría usando diaminobencidina como sustrato.

En los resultados obtenidos se muestra positividad tanto en las regiones aledañas al bulbo piloso, así como en la epidermis en todas las muestras posteriores al tratamiento con Cerebrolisina (Figura 11D–F) en las cuales se presenta una mayor cantidad de células positivas en comparación con las muestras previas al tratamiento (Figura 11A–C) en donde observamos una nula expresión del marcador MART-1/Melan-A. En la Figura 12 se muestra que, en secciones transversales de los bulbos pilosos, se logró detectar que existen células positivas para MART-1/Melan-A, implicando así que son melanocitos activos que se ubican en las regiones basales (A), media (B) y superior (C), siendo de mayor prevalencia en la zona basal y media.

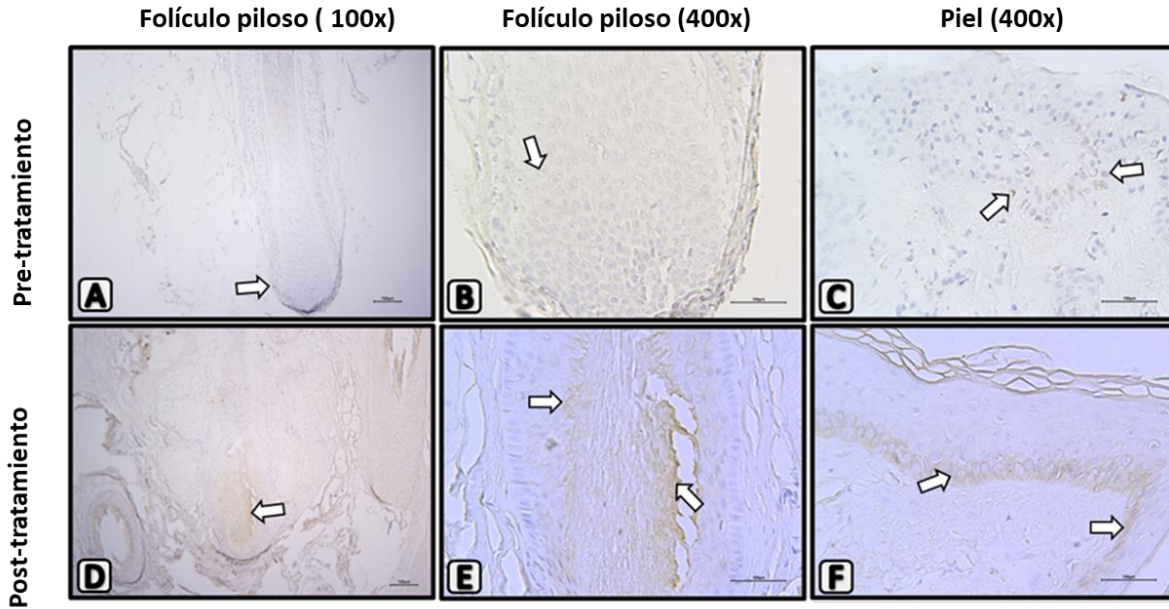


Figura 11. Inmunodetección de la expresión de MART-1/Melan-A, marcador de melanocitos con síntesis de melanosomas, en distintas regiones del cuero cabelludo.

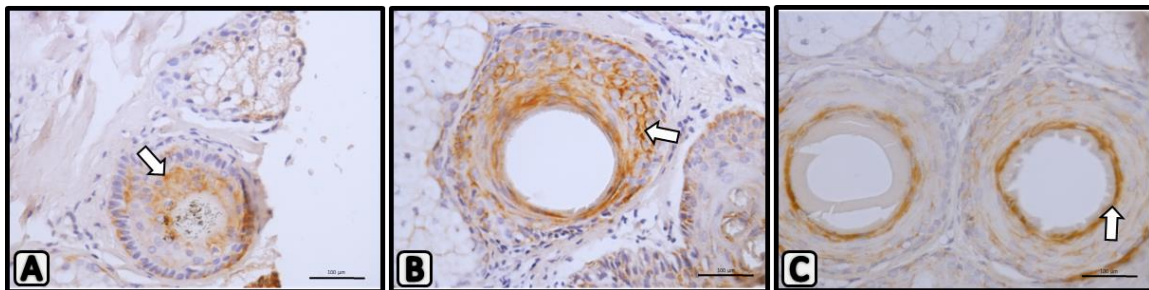


Figura 12. Patrón de expresión de MART-1/Melan-A en distintas regiones del folículo piloso. A región basal; B región media; C región superior. Magnificación de 400x.

El tratamiento con Cerebrolisina provoca un aumento en el depósito y acumulación de melanina dentro del folículo piloso.

Posteriormente se realizaron los análisis histopatológicos e histoquímicos para determinar si existe un incremento en la cantidad de melanina en los folículos pilosos. En el análisis

morfológico por tinción de hematoxilina y eosina (Figura 13) se observaron características morfológicas de un cuero cabelludo sano sin alteraciones significativas que indicasen un padecimiento concomitante al encanecimiento. En este análisis se logró detectar que después del tratamiento con Cerebrolisina hay un ligero aumento de señal oscura en las regiones basales de la epidermis del cuero cabelludo y bulbos pilosos, esto concuerda con la localización de los melanocitos y podría implicar un aumento en la producción de melanina. Por último, también se observó que en el tallo del cabello (Figura 13E) también existe una mayor pigmentación.

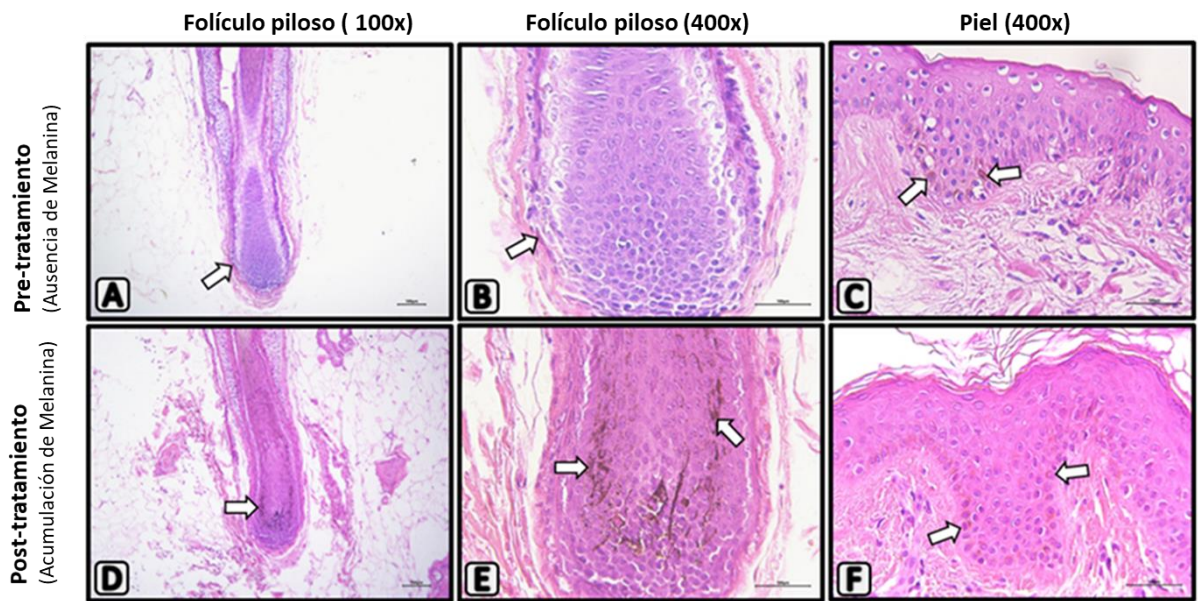


Figura 13. Análisis histopatológico por tinción con hematoxilina y eosina de las biopsias de cuero cabelludo.

Para validar la anterior observación, se realizó una histoquímica de Fontana-Masson para identificar específicamente la melanina por impregnación de plata. En la Figura 14A, los resultados muestran que la positividad de melanina era evidente tanto en el bulbo piloso como en la piel de las muestras de todos los pacientes después del tratamiento con

Cerebrolisina. Se detectó depósito de melanina a lo largo de la corteza del folículo piloso (Fig. 14A “E”), así como un mayor número de melanocitos con inclusiones de melanina en el estrato basal de la epidermis (Fig. 14A “F”). Además, un análisis densitométrico usando el programa ImageJ detectó que existe un incremento de hasta de cuatro veces ($p \leq 0.01$) de señal de melanina en las muestras tras el tratamiento con Cerebrolisina con respecto a las muestras antes del tratamiento (Fig. 14B).

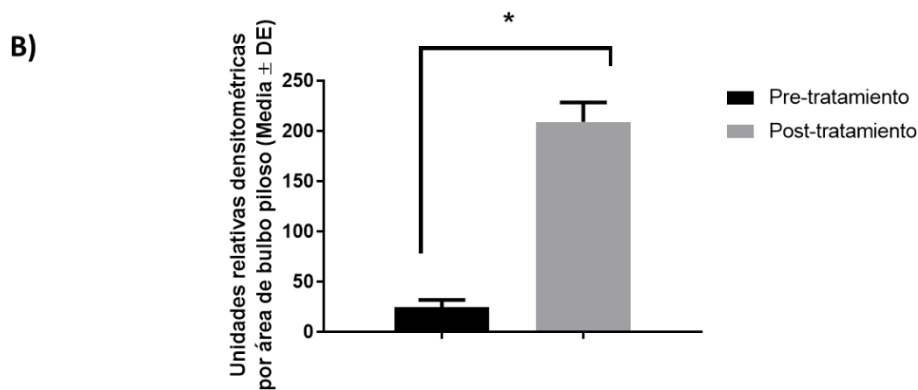
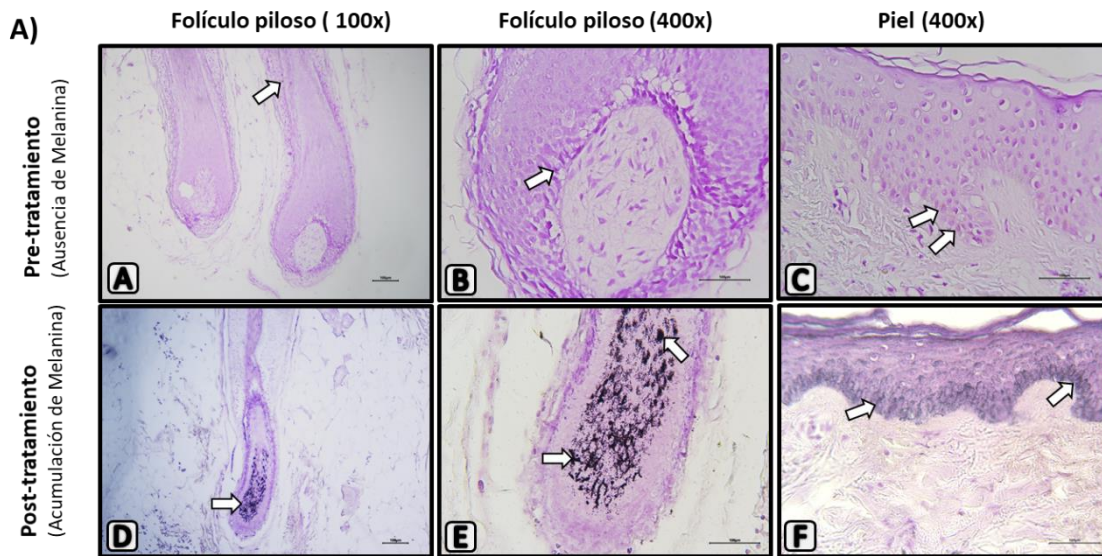


Figura 14. Histoquímica de Fontana-Masson para la detección de melanina en distintas regiones del cuero cabelludo.

DISCUSIÓN

El proceso de senescencia celular conlleva a la reducción de las funciones celulares, siendo en el caso del encanecimiento del cabello como uno de los signos característicos del envejecimiento y que dicho proceso ocurre por la pérdida progresiva de la producción de pigmento en los tallos de los folículos pilosos.²⁶

La melanina es el principal factor que da el tono de la piel y del cabello, y este pigmento es producido por los melanocitos a través de un proceso conocido como melanogénesis. Tras su síntesis, este pigmento es transportado hacia los queratinocitos que componen a la piel y al cabello, y cuya finalidad es proteger al genoma de dichas células de la radiación ultravioleta de la luz solar. Existen dos variantes de la melanina: la eumelanina que presenta una coloración parda a negra y la feomelanina que presenta una coloración naranja-rojiza, siendo la primera la de mayor prevalencia y de mejor protección.²⁷

El proceso de encanecimiento ocurre independiente al género o raza étnica del afectado, pero si existen reportes que la edad de inicio puede diferir entre la población, siendo vinculado a la genética y su susceptibilidad al encanecimiento.^{26,28}. Se ha descrito que la pérdida de las células madre CD200+ asociadas a los folículos pilosos provoca una pérdida de pigmentación en el cuero cabelludo relacionada con el envejecimiento cronológico y la senescencia celular.²⁹

Estas células madre CD200+ residen en un nicho dentro del folículo piloso, pero su progenie de melanocitos diferenciados son los que residen en el bulbo del folículo piloso, lugar donde se encuentran produciendo y secretando melanina para su incorporación gradual en el tallo del cabello en crecimiento. Sin embargo, la ausencia o disfunción de las células madre no siempre es la causa de la aparición del encanecimiento, y esto se debe a que los melanocitos pueden estar presentes en el bulbo piloso pero presentan una disminución en la señalización de síntesis de melanina y por ende una reducción de la pigmentación en el cabello.^{30,31}

En el presente trabajo se realizaron ensayos para detectar la reactivación del melanosoma, un organelo membranoso para la síntesis y almacenaje de la melanina, mediante el inmunomarcaje para Melan-A, también conocido como MART-1, el cual es un factor clave para la biogénesis temprana del melanosoma^{20,32}.

Nosotros logramos detectar un incremento en el número de melanocitos que presentan un aumento en la expresión de MART-1/Melan-A en las muestras colectadas al término del tratamiento en comparación con antes del inicio de la administración de Cerebrolisina. Esto nos indica que los melanocitos residentes en el cuero cabelludo están presentando una reactivación a nivel molecular, por lo que podría atribuirse que a pesar de la senescencia celular ligada a la edad avanzada de los pacientes es posible que los neuropéptidos de la Cerebrolisina podrían inducir la síntesis de novo de la melanina.

Posteriormente, esto fue corroborado en los análisis de Fontana-Masson, en donde observamos que existe una intensidad de melanina principalmente en la zona del bulbo piloso, por lo cual el melanosoma no solo es reactivado, sino que es transportado e incorporado en los queratinocitos del folículo piloso en crecimiento.³³ A pesar que en el análisis macroscópico aún se logran percibir cabellos con las puntas grises, se espera que la incorporación de la melanina en la raíz de los folículos pilosos y su futuro crecimiento resulte en la reducción de cabello con puntas grises.

En la actualidad, no existen reportes en la literatura sobre el impacto de la Cerebrolisina en el desarrollo del folículo piloso y en particular en los melanocitos. Sin embargo, se ha determinado que la Cerebrolisina posee propiedades de factores neurotróficos³⁴⁻³⁶, y estos factores neurotróficos son componentes esenciales para el microambiente de las células madre. Un ejemplo es el receptor RET para factores neurotróficos, expresado en las células madre, y cuando éste es estimulado por los factores neurotróficos, se induce un aumento en la supervivencia, expansión y su capacidad funcional.³⁷ Por lo que estos podrían estar influyendo en la generación de nuevos melanocitos a partir de las células madre presentes en el folículo piloso.¹⁵ Así también, se ha reportado que la activación del receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) es crucial para la regulación de la apoptosis en la vaina externa de la raíz del folículo piloso, en la que se encuentra un nicho de células madre.³⁸ Todo lo anterior evidencian las relaciones estrechas entre los factores neurotróficos, las células madre y los folículos pilosos.

Se ha reportado que la Cerebrolisina contiene elementos que otorgan efectos neurotróficos y neuroprotectores sobre la supervivencia neuronal en distintos modelos de regeneración de lesiones en ensayos in vitro, así como en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas.^{23,39}

La propuesta del mecanismo de acción se basa en la modulación de los procesos neurobiológicos que corresponde al neurotrofismo, la neuroprotección, la neuroplasticidad y la neurogénesis. ^{34,35,40} Los melanocitos al ser células derivadas de la cresta neural en el desarrollo embrionario, podemos hipotetizar que son células sensibles o inducibles por los neuropéptidos presentes en la Cerebrolisina, generándose una activación de la maquinaria del melanosoma que culmina en el aumento de la pigmentación del cabello observado en los pacientes tratados con Cerebrolisina por 3 ciclos.

En nuestro estudio detectamos al marcador MART-1/Melan-A sobreexpresado, sin embargo, este factor está involucrado en el melanosoma y se desconoce específicamente que otras señalizaciones iniciales de la activación de los melanocitos podrían estar involucradas. La terapia con Cerebrolisina es capaz de reducir significativamente el número de neuronas que mueren por apoptosis en un modelo por exposición a glutamato,³⁴ bloqueando las vías proteolíticas de la apoptosis in vitro en las neuronas además de inclusive provocar un aumento en la viabilidad y proliferación celular.⁴¹

Otro estudio muestra que el tratamiento con Cerebrolisina es capaz de aumentar los niveles de proliferación, diferenciación y migración de las células progenitoras neurales de la zona subventricular del cerebro. ⁴² Aunado a las funciones de neuroprotección previamente dichas, estudios han mostrado un efecto protector contra la apoptosis inducida por estrés oxidativo en un modelo in vitro de linfocitos humanos ³⁴ y neuronas ²¹. Con todos los reportes previamente mencionados, se podría inferir que las vías de señalización asociadas a la proliferación, migración y supervivencia de los melanocitos ante el estrés oxidativo participe en las causas del encanecimiento del cabello. ⁴³

En los pacientes que han sufrido una lesión cerebral aguda se presenta una reducción en los niveles séricos de la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), ⁴⁴ y en las terapias que involucra la administración de Cerebrolisina en conjunto con terapias de células madre induce una mayor protección en la patología de Alzheimer. ⁴⁵ En distintas revisiones ^{15,46} se ha descrito que los melanocitos foliculares y los epidérmicos presentes en la piel presentan distintas características y tipos de respuestas a señales neurotróficas, por lo cual, es de interés evaluar los cambios en la α -MSH en los pacientes con encanecimiento severo antes y después del tratamiento con Cerebrolisina.

CONCLUSIONES

- La Cerebrolisina prescrita como terapia para mantenimiento neurológico es capaz de inducir la repigmentación de los folículos pilosos presentes en el cuero cabelludo de los pacientes.
- Todos los pacientes participantes presentaron una mejora en la apariencia macroscópica del cuero cabelludo, en las cuales destaca un cabello más pigmentado y de mayor volumen.
- El aumento de pigmentación está asociado a la sobre-expresión de MART-1/Melan-A, en melanocitos residentes en cuero cabelludo, factor necesario para la biogénesis del melanosoma.
- La activación del melanosoma es efectiva, ya que culmina en el transporte y depósito de la melanina en los folículos pilosos del cuero cabelludo.
- A nuestro conocimiento, este es el primer reporte científico que documenta el impacto de Cerebrolisina en la repigmentación del folículo piloso, y en particular en la activación de los melanocitos.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la activación de los melanocitos en otros trastornos asociados a la disminución de melanosoma.
- Determinar si existe una activación y proliferación de células madre de melanocitos.
- Describir las vías de señalización involucradas en la reactivación celular observada en respuesta a la Cerebrolisina.
- Evaluar a largo plazo la permanencia de los efectos de la pigmentación folicular por el uso de la Cerebrolisina.

REFERENCIAS

1. Ageing - Demographics. <https://platform.who.int/data/maternal-newborn-child-adolescent-ageing/static-visualizations>.
2. Martinez, R. *et al.* Life expectancy, healthy life expectancy, and burden of disease in older people in the Americas, 1990-2019: a population-based study. *Rev. Panam. Salud Publica Pan Am. J. Public Health* **45**, e114 (2021).
3. Jin, K., Simpkins, J. W., Ji, X., Leis, M. & Stambler, I. The Critical Need to Promote Research of Aging and Aging-related Diseases to Improve Health and Longevity of the Elderly Population. *Aging Dis.* **6**, 1–5 (2014).
4. Kudo, S., Mutisya, E. & Nagao, M. Population Aging: An Emerging Research Agenda for Sustainable Development. *Soc. Sci.* **4**, 940–966 (2015).
5. Gu, D., Andreev, K. & Dupre, M. E. Major Trends in Population Growth Around the World. *China CDC Wkly.* **3**, 604–613 (2021).
6. Angel, J. L., Vega, W. & López-Ortega, M. Aging in Mexico: Population Trends and Emerging Issues. *The Gerontologist* **57**, 153–162 (2017).
7. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). <https://www.inegi.org.mx/>.
8. Demography - Old-age dependency ratio - OECD Data. *theOECD* <http://data.oecd.org/pop/old-age-dependency-ratio.htm>.
9. Mylonas, A. & O’Loughlen, A. Cellular Senescence and Ageing: Mechanisms and Interventions. *Front. Aging* **3**, (2022).
10. McHugh, D. & Gil, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.* **217**, 65–77 (2017).

11. Katzir, I. *et al.* Senescent cells and the incidence of age-related diseases. *Aging Cell* **20**, e13314 (2021).
12. Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A. & Campisi, J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* **118**, 485–496 (2005).
13. Del Rey, M. J. *et al.* Senescent synovial fibroblasts accumulate prematurely in rheumatoid arthritis tissues and display an enhanced inflammatory phenotype. *Immun. Ageing A* **16**, 29 (2019).
14. Teissier, T., Boulanger, E. & Cox, L. S. Interconnections between Inflammaging and Immunosenescence during Ageing. *Cells* **11**, 359 (2022).
15. Zhao, Z., Pan, X., Liu, L. & Liu, N. Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J. Cell. Physiol.* **229**, 1323–1329 (2014).
16. Chandek, C. & Mooi, W. J. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv. Anat. Pathol.* **17**, 42–48 (2010).
17. Martini, H. & Passos, J. F. Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. *FEBS J.* **290**, 1186–1202 (2023).
18. Tobin, D. J. Human hair pigmentation--biological aspects. *Int. J. Cosmet. Sci.* **30**, 233–257 (2008).
19. Moreiras, H., Seabra, M. C. & Barral, D. C. Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4466 (2021).
20. Lin, J. Y. & Fisher, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* **445**, 843–850 (2007).
21. Tobin, D. J. The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 75–88 (2011).

22. Sarin, K. Y. & Artandi, S. E. Aging, graying and loss of melanocyte stem cells. *Stem Cell Rev.* **3**, 212–217 (2007).
23. Steingrímsson, E., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Melanocyte stem cell maintenance and hair graying. *Cell* **121**, 9–12 (2005).
24. Kumar, A. B., Shamim, H. & Nagaraju, U. Premature Graying of Hair: Review with Updates. *Int. J. Trichology* **10**, 198–203 (2018).
25. Mohanty, S., Kumar, A., Dhawan, J., Sharma, V. K. & Gupta, S. Depletion of CD200+ Hair Follicle Stem Cells in Human Prematurely Gray Hair Follicles. *J. Cutan. Aesthetic Surg.* **6**, 90–92 (2013).
26. Nishimura, E. K., Granter, S. R. & Fisher, D. E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* **307**, 720–724 (2005).
27. Schiaffino, M. V. SIGNALING PATHWAYS IN MELANOSOME BIOGENESIS AND PATHOLOGY. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1094–1104 (2010).
28. Marçon, C. R. & Maia, M. Albinism: epidemiology, genetics, cutaneous characterization, psychosocial factors. *An. Bras. Dermatol.* **94**, 503–520 (2019).
29. Setaluri, V. Sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: signals, pathways, and mechanisms. *Pigment Cell Res.* **13**, 128–134 (2000).
30. De Mazière, A. M. *et al.* The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic Cph. Den.* **3**, 678–693 (2002).
31. Kim, K.-H., Kabir, E. & Jahan, S. A. The use of personal hair dye and its implications for human health. *Environ. Int.* **89–90**, 222–227 (2016).
32. Trüeb, R. M. Pharmacologic interventions in aging hair. *Clin. Interv. Aging* **1**, 121–129 (2006).

33. Hutter-Paier, B., Steiner, E. & Windisch, M. Cerebrolysin protects isolated cortical neurons from neurodegeneration after brief histotoxic hypoxia. *J. Neural Transm. Suppl.* **53**, 351–361 (1998).
34. Lombardi, V. R., Windisch, M., García, M. & Cacabelos, R. Effects of Cerebrolysin on in vitro primary microglial and astrocyte rat cell cultures. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **21**, 331–338 (1999).
35. Poon, W. *et al.* Cerebrolysin Asian Pacific trial in acute brain injury and neurorecovery: design and methods. *J. Neurotrauma* **32**, 571–580 (2015).
36. Gharagozli, K. *et al.* Efficacy and safety of Cerebrolysin treatment in early recovery after acute ischemic stroke: a randomized, placebo-controlled, double-blinded, multicenter clinical trial. *J. Med. Life* **10**, 153–160 (2017).
37. gov.mx. *gov.mx*
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/145562/Regalopa2005.pdf>.
38. Thome, J. & Doppler, E. Safety profile of Cerebrolysin: clinical experience from dementia and stroke trials. *Drugs Today Barc. Spain 1998* **48 Suppl A**, 63–69 (2012).
39. Zangiabadi, N., Shabani, M. & Jafari, M. Neuroprotective Effect of Cerebrolysin on Diabetic Neuropathy: A Study on Male Rats. *Diabetes Metab.* **5**, (2014).
40. Formichi, P. *et al.* Cerebrolysin administration reduces oxidative stress-induced apoptosis in lymphocytes from healthy individuals. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2840–2843 (2012).
41. Ubhi, K. *et al.* Cerebrolysin modulates pronerve growth factor/nerve growth factor ratio and ameliorates the cholinergic deficit in a transgenic model of Alzheimer’s disease. *J. Neurosci. Res.* **91**, 167–177 (2013).
42. Onose, G. *et al.* Neuroprotective and consequent neurorehabilitative clinical outcomes, in patients treated with the pleiotropic drug cerebrolysin. *J. Med. Life* **2**, 350–360 (2009).

43. Zhang, C. *et al.* Cerebrolysin enhances neurogenesis in the ischemic brain and improves functional outcome after stroke. *J. Neurosci. Res.* **88**, 3275–3281 (2010).
44. Alvarez, X. A. *et al.* Efficacy and safety of Cerebrolysin in moderate to moderately severe Alzheimer's disease: results of a randomized, double-blind, controlled trial investigating three dosages of Cerebrolysin. *Eur. J. Neurol.* **18**, 59–68 (2011).
45. Heiss, W.-D. *et al.* Cerebrolysin in patients with acute ischemic stroke in Asia: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Stroke* **43**, 630–636 (2012).
46. Fonseca-Pereira, D. *et al.* The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function. *Nature* **514**, 98–101 (2014).
47. Botchkarev, V. A. *et al.* A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 1931–1942 (2000).
48. Zdrojewicz, Z., Kowalik, M. & Jagodziński, A. [Secrets of the red-headed]. *Pol. Merkur. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.* **41**, 306–309 (2016).
49. Schallreuter, K. U., Salem, M. A. E. L., Holtz, S. & Panske, A. Basic evidence for epidermal H₂O₂/ONOO(-)-mediated oxidation/nitration in segmental vitiligo is supported by repigmentation of skin and eyelashes after reduction of epidermal H₂O₂ with topical NB-UVB-activated pseudocatalase PC-KUS. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 3113–3122 (2013).
50. Hoashi, T. *et al.* MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 14006–14016 (2005).
51. Kocaman, S. A. *et al.* The degree of premature hair graying as an independent risk marker for coronary artery disease: a predictor of biological age rather than chronological age. *Anadolu Kardiyol. Derg. AKD Anatol. J. Cardiol.* **12**, 457–463 (2012).

52. Vázquez-Roque, R. A., Ubhi, K., Masliah, E. & Flores, G. Chronic cerebrolysin administration attenuates neuronal abnormalities in the basolateral amygdala induced by neonatal ventral hippocampus lesion in the rat. *Synap. N. Y. N* **68**, 31–38 (2014).
53. Botchkarev, V. A. *et al.* A role for p75 neurotrophin receptor in the control of apoptosis-driven hair follicle regression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 1931–1942 (2000).
54. Powers, W. J. *et al.* 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **49**, e46–e110 (2018).
55. Hartbauer, M., Hutter-Paier, B., Skofitsch, G. & Windisch, M. Antiapoptotic effects of the peptidergic drug cerebrolysin on primary cultures of embryonic chick cortical neurons. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **108**, 459–473 (2001).
56. Inomata, K. *et al.* Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell* **137**, 1088–1099 (2009).
57. Magnoni, S. *et al.* Alpha-melanocyte-stimulating hormone is decreased in plasma of patients with acute brain injury. *J. Neurotrauma* **20**, 251–260 (2003).
58. Sharma, H. S. *et al.* Co-Administration of TiO₂ Nanowired Mesenchymal Stem Cells with Cerebrolysin Potentiates Nephilysin Level and Reduces Brain Pathology in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **55**, 300–311 (2018).