

ABSTRACT- Jesús Devesa

Encefalopatía epiléptica en el SW: papel del Factor de Crecimiento IGF-1 Hormona de crecimiento en encefalopatías infantiles

Catedrático de Fisiología

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina, Santiago de Compostela,
y Centro Médico "Fundación Foltra", Teo, España

Hasta hace pocos años estaba establecido que la recuperación de un daño cerebral ocurría a expensas del desarrollo y refuerzo de mecanismos de plasticidad neural. La creación de nuevas conexiones sinápticas entre las neuronas que habían sobrevivido al daño haría factible el que al menos parcialmente se recuperasen una serie de funciones cerebrales perdidas tras aquél.

Una serie de evidencias indican que el enriquecimiento medioambiental induce cambios epigenéticos que facilitan la sinaptogénesis en modelos de plasticidad cerebral. Sobre esta base la creación de unidades asistenciales especiales para la recuperación cerebral debieran permitir el establecimiento del ambiente más enriquecido para el tratamiento de pacientes con daño cerebral adquirido. Cualquier aspecto que pudiese optimizar el ambiente de rehabilitación, hospitalario o extrahospitalario, se traduciría en efectos beneficiosos a nivel de la recuperación del paciente.

Actualmente sabemos que, además de la plasticidad cerebral, el establecimiento de un daño cerebral rápidamente lleva a un incremento en la diaria proliferación de células madre neurales. Desde las zonas cerebrales dañadas se liberan una serie de citoquinas responsables de la activación de la migración y diferenciación de las células neurales neoformadas. Recientemente se ha identificado un receptor tipo PY2, denominado GPR17, que actúa como un sensor de daño cerebral y es una nueva diana para reparar el daño (Lecca et al., 2008). Tras un daño cerebral aumentan significativamente las concentraciones extracelulares de nucleótidos de glucosa y galactosa así como las de cisteinil-leucotrienos (cysLTs), dos familias de moléculas de señalización endógena cuyo matcado incremento en la zona del daño sugiere que pueden actuar como "señales de peligro" para alertar de la existencia de un daño y poner en marcha la reparación cerebral. En el telencéfalo, GPR17 se encuentra presente en neuronas y en una subpoblación parenquimatosa de células quiescentes precursoras de oligodendrocitos. La inducción de un daño cerebral mediante isquemia focal en ratas lleva a un intenso cambio espacio-temporal de la expresión de GPR17. En el área lesionada rápidamente se observa un incremento de la expresión de GPR17 en neuronas que expresan el marcador de daño celular Hsp70 (*Heat shock protein 70*). Imágenes obtenidas mediante resonancias magnéticas realizadas en ratones vivos muestran que la deleción farmacológica o biotecnológica del receptor GPR17 claramente impide la evolución del infarto cerebral, lo que sugiere que GPR17 es un mediador de la muerte neuronal en las primeras fases de la isquemia. Pocas horas más tarde, se puede detectar GPR17 en microglia y macrófagos que infiltran el área lesionada, lo que indica que GPR17 puede participar también en la remodelación por la microglia de los circuitos

cerebrales. En esta fase, comienza a observarse proliferación de progenitores de oligodendrocitos que expresan GPR17 alrededor del área dañada lo que indica el comienzo de la remielinización. La exposición *in vitro* de pre-oligodendrocitos corticales a los logandos endógenos de GPR17, como UDP-glucosa y LTD4, promueve la expresión de la proteína básica de mielina, lo que confirma que aquellas células precursoras evolucionan hacia oligodendrocitos maduros. Todo ello indica que, en efecto, GPR17 puede actuar como un "sensor" que es activado tras daño cerebral en una serie de células precursoras neurales cerebrales, y puede jugar un doble papel clave tanto induciendo la muerte neuronal en el área que ha sufrido la isquemia como dirigiendo la respuesta local de remodelación reparadora (Lecca et al., 2008).

De acuerdo con esos conceptos, en el intento de reparar un daño cerebral actúan dos mecanismos diferentes: 1) rápida proliferación de precursores neurales, tras el daño, y 2) más tardíamente, desarrollo de plasticidad neural.

Ambos son independientes, pero complementarios entre sí, y ambos, para ejecutarse correctamente, requieren de la intervención de factores neurotróficos.

El paradigma de un sistema nervioso incapaz de reemplazar la pérdida diaria de neuronas comenzó a ser cuestionado en la década de los años 60. Actualmente sabemos que en una serie de nichos específicos del cerebro adulto del mamífero existe producción de nuevas neuronas (neurogénesis). Tras daño cerebral, como el inducido por isquemia, epilepsia, o degeneración neuronal focal, la neurogénesis aumenta y las nuevas neuronas creadas son capaces de repoblar áreas dañadas (Parent, 2002; Romanko et al., 2004; Zhang et al., 2004). Incluso es factible, y así se cree actualmente, que en el cerebro adulto se pueden eliminar las influencias antineurogénicas fisiológicas tanto en condiciones patológicas como tras un daño específico. Por ello, el conocimiento acerca de cómo está regulada la neurogénesis del adulto es un objetivo científico actual ya que a partir de él se podrán desarrollar herramientas terapéuticas específicas que permitan la reparación cerebral tras un daño.

Desde hace unos años sabemos que la neurogénesis del adulto puede ser modulada por una serie de procesos fisiológicos, tales como el aprendizaje, ejercicio físico voluntario, enriquecimiento ambiental o el stress (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999; van Praag et al., 1999; Trejo et al., 2001; Lledo et al., 2006; Zhao et al., 2008). Muchos, si no todos, de estos procesos están relacionados con señales mediadas por hormonas o factores de crecimiento. Entre éstos, el sistema Hormona de Crecimiento (GH)/IGF-I parece jugar un papel clave en la regulación de la neurogénesis del cerebro adulto.

La GH es una hormona pleiotrópica que se expresa no solo en la hipófisis anterior si no también en prácticamente cualquier tejido (Devesa et al., 2010b). Por ello, bastante más allá de lo que son sus conocidos efectos sobre el crecimiento longitudinal del organismo y el metabolismo intermediario, la hormona juega un importante papel en la regulación de la proliferación y supervivencia celular en una serie de tejidos, incluyendo el sistema nervioso central (SNC) (Costoya et al., 1999; Sanders et al., 2009; McLenachan et al., 2009; Aberg et al., 2009).

La hipótesis de que GH e IGF-I juegan un papel en la reparación cerebral tras un daño se postuló hace ya unos años. Pese a que una serie de autores han descrito la expresión de GH en el SNC, su papel fisiológico a este nivel y, en particular, su posible contribución a la reparación de daños neurológicos, no está aún bien establecida, pese a

que los efectos positivos del tratamiento con GH sobre la neurogénesis del adulto se han demostrado en animales de laboratorio (McLenachan et al., 2009; Christophidis et al., 2009; Svensson et al., 2008; P. Devesa et al., 2011), y que recientes datos de nuestro grupo y otros sugieren que la hormona puede jugar un papel similar en el paciente humano (Devesa et al., 2009; High et al., 2010; Reimunde et al., 2010; Reimunde et al., 2011; Devesa et al., 2011).

La neurogénesis dirigida por GH puede depender también de la producción local de la hormona en células madre neurales (P. Devesa et al., 2011), el que en su día denominamos "sistema periférico de GH", que puede ser activado tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Devesa et al., 2010b).

De acuerdo con otros trabajos, nuestro grupo demostró que las células precursoras del hipocampo expresan GH en condiciones basales, y, lo que aún es más interesante, que el número de células que expresan GH aumenta tras un daño cerebral inducido por la administración de ácido kaínico a ratas (P. Devesa et al., 2011). Incluso, demostramos que prácticamente todas las células que expresan GH en hipocampo eran células neofomadas, lo que sugiere la existencia de una fuerte relación entre la expresión de la hormona y la proliferación de los precursores neurales (P. Devesa et al., 2011).

Datos del grupo de Katakowski (Katakowski et al., 2003) demuestran que la activación de la vía de transducción de señales PI3K/Akt media la migración de neuroblastos hacia áreas cerebrales que acaban de sufrir un daño, probablemente para inducir regeneración. Esta vía de señalización PI3K/Akt es clave para la inducción de efectos intracelulares por GH (Costoya et al., 1999). A mayores, el grupo de Scheepens demostró que la expresión de GH y su receptor aumenta considerablemente tras un daño cerebral y se asocia específicamente con las neuronas dañadas y glía (Scheepens et al., 2000). Más recientemente, el mismo grupo demostró que durante la recuperación de un daño cerebral producido por isquemia, se activa un eje cerebral GH; los niveles del receptor de GH (GHR) aumentan significativamente en la Zona Subventricular del hemisferio dañado, coincidiendo tanto espacial como temporalmente con la neurogénesis inducida por el daño. Las poblaciones celulares que expresan este aumento del GHR incluyen células en proliferación, progenitores neurales y neuroblastos en migración (Christophidis et al., 2009).

Como ya hemos indicado una serie de evidencias experimentales apoyan el que la GH juegue un importante papel en la neurogénesis. El receptor de la hormona se expresa en regiones cerebrales en las que se produce neurogénesis durante el desarrollo embrionario (García-Aragón et al., 1992; Turnley et al., 2002) y en zonas neurogénicas del cerebro adulto de rata (Lobie et al., 1993). La propia hormona se encuentra en células de la zona ventricular durante la neurogénesis embrionaria (Turnley et al., 2002), y se produce en el hipocampo postnatal (Donahue et al., 2002; Donahue et al., 2006; Sun et al., 2005a; Sun et al., 2005b). Es también interesante el que la expresión del gen de GH en hipocampo aumenta en respuesta a una serie de factores de los que se conoce que potencian la neurogénesis (Parent, 2003), incluyendo el aprendizaje (Donahue et al., 2002) y los estrógenos (Donahue et al., 2006).

El estudio de los efectos de GH en cultivos celulares de corteza cerebral embrionaria de rata (Ajo et al., 2003) e hipocampo (Byts et al., 2008) demuestran que la hormona induce la proliferación y diferenciación de esas células. En conjunto, todos esos hallazgos experimentales indican que la GH puede facilitar la proliferación, diferenciación

y supervivencia de nuevas neuronas en respuesta a daño cerebral. En futuros estudios se aclarará si la GH "es llamada" para la reparación cerebral tras la activación del antes descrito sensor de daño GPR17.

Sobre esas bases estudiamos un posible papel de la GH y su receptor sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia de células madre neurales (NSCs) *in vitro*. Las NSCs se aislaron de la Zona Subgranular del Giro Dentado del hipocampo de ratones de 9 días de edad y se cultivaron hasta formar neuroesferas. Mediante técnicas de Western blot e inmunofluorescencia comprobamos que las neuroesferas derivadas de aquellas NSCs expresaban GH y su receptor tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación. Ambos, GH y su receptor, se colocalizaban con nestina y SOX2, marcadores de células indiferenciadas o células en desarrollo. Igualmente, las células que migraban de las neuroesferas mostraban la presencia del receptor de GH. Todo ello indica que la hormona y su receptor parecen ser necesarios para el desarrollo de una neurogénesis fisiológica.

La Parálisis Cerebral (CP) es una enfermedad catastrófica adquirida durante el desarrollo del cerebro fetal o postnatal. Principalmente afecta a los centros de control motor en el cerebro en desarrollo, pero también puede afectar a las funciones cognitivas, y es acompañada habitualmente por una cohorte de síntomas entre los que se incluyen falta de comunicación, epilepsia, alteraciones de conducta y ceguera.

Las principales causas de CP incluyen desarrollos cerebrales anormales intrauterinos, debidos a infecciones materno-fetales, asfixia prenatal, hipoxia durante el parto, traumatismo cerebral durante el parto, y complicaciones en el período perinatal. Además de éstas, la prematuridad es responsable del 40-50% de los casos de CP. La Leucomalacia periventricular (PVL) y el infarto del parénquima cerebral se reconocen desde hace tiempo como las dos afectaciones de la sustancia blanca más significativas como responsables de la mayoría de los casos de CP en los que sobreviven a un parto prematuro.

Sin embargo, estudios recientes en los que se utiliza resonancia magnética para valorar el cerebro prematuro, han documentado la existencia de dos nuevas afectaciones que se añaden al espectro de las alteraciones de la sustancia blanca en la prematuridad: lesiones punteadas de la sustancia blanca y excesivamente elevada y difusa intensidad de la señal. Parecen ser más comunes que la PVL pero menos significativas en términos de su impacto sobre el desarrollo neurológico del paciente. Pese a ello, pueden asociarse con alteraciones cognitivas y de conducta que aparecen más tardíamente y son comunes en la prematuridad.

Muchos de los niños con CP presentan un crecimiento disminuido durante la infancia, que resulta en una baja talla adulta. Nuestro grupo estudió si existía afectación de la secreción de GH en niños con CP, responsable de esa afectación del crecimiento. Los resultados obtenidos indicaron que el 70% de los pacientes presentaban una alteración en la secreción de GH (Devesa et al, 2010a) por lo que eran subsidiarios de recibir una terapia de reemplazo con la hormona.

En un estudio reciente describimos (Devesa et al., 2011) los efectos positivos del tratamiento con GH administrado conjuntamente con estimulación psicomotriz y cognitiva en 11 pacientes (7 varones, 4 hembras; con edades entre 3 y 7 años) que presentaban CP y déficit de GH (GHD). Las evaluaciones cognitivas se llevaron a cabo mediante el test

de Battelle (BDIST). Los tests se realizaron en una primera evaluación, dos meses después de haber con la estimulación psicomotriz y cognitiva y dos meses después de haber añadido un tratamiento con GH a ese tipo de estimulación. Todos los pacientes habían recibido una intensa estimulación previa, en muchos casos desde su primer año de vida.

La estimulación psicomotriz y cognitiva no se tradujo en mejoras significativas en el BDSIT, lo que sí ocurrió en todos los dominios que valora este test cuando se añadió el tratamiento con GH. Específicamente, la adición de la hormona llevó a una significativa mejora en sus habilidades personales y sociales, conducta adaptativa, habilidades motoras y capacidades psicomotrices, recepción y comunicación, capacidades cognitivas y en el conjunto del test ($p < 0.01$), así como en capacidades motoras finas y comunicación expresiva ($p < 0.02$). Como era previsible, los niveles plasmáticos de IGF-I e IGFBP3 aumentaron significativamente tras el tratamiento con GH.

Esos resultados nos llevaron a concluir que el tratamiento combinado con GH y estimulación psicomotriz y cognitiva es de gran utilidad para un apropiado desarrollo neurológico de niños con CP y GHD (Devesa et al., 2011). Puesto que esos pacientes habían recibido una intensa estimulación previa antes de ser tratados con la hormona, sin haber obtenido cambios significativos, parece claro que la hormona y/o IGF-I es el factor principalmente responsable de los resultados obtenidos. Pero además, puesto que la GH exógena puede llevar a cabo una acción sinérgica en la reparación del daño cerebral con la GH producida localmente (P. Devesa et al., 2011) es factible asumir que el tratamiento puede ser también de utilidad en pacientes con CP sin déficit de GH.

En otro estudio (Reimunde et al., 2011), evaluamos los efectos del tratamiento con hormona de crecimiento combinado con rehabilitación física sobre la recuperación de funciones motoras en niños con CP y GHD (4 varones y 6 hembras, edad media 5.63 ± 2.32 años) comparada con la observada en una población similar de niños con CP no deficitarios en GH (5 varones, 5 hembras; edad media 5.9 ± 2.18 años) en los que solo se utilizó el mismo tipo de rehabilitación física, durante dos meses. Para valoración de los resultados se utilizaron la Medida de la Función Motora Gruesa (GMFM-88) y la Escala Modificada de Assworth. Estas evaluaciones se llevaron a cabo antes de comenzar los tratamientos y a los dos meses de éstos. La GMFM-88 es una escala diseñada para evaluación de los cambios en la Función Motora Gruesa en niños con CP y consta de 88 ítems agrupados en 5 dimensiones: Dimensión A (rodar por el suelo, 17 ítems), Dimensión B (sedestación, 20 ítems), Dimensión C (arrastrarse de rodillas, 14 ítems), dimensión D (mantenerse de pie, 13 ítems) y Dimension E (caminar, correr y saltar, 24 ítems).

En niños con CP y GHD las Dimensiones A, B y C mejoraron significativamente tras el tratamiento ($p < 0.02$) al igual que la puntuación total del test ($p < 0.01$), mientras que no se observaron cambios significativos en las Dimensiones D y E. En 4 de los 5 pacientes con espasticidad en este grupo ésta se redujo substancialmente. Por el contrario, en los pacientes CP no GHD que no recibieron GH tan solo se obtuvo una mejora significativa en la puntuación total de la GMFM-88 tras el período de tratamiento. Los niveles plasmáticos de IGF-I (previamente en niveles bajos en los pacientes CP GHD) fueron similares en ambos grupos de pacientes al finalizar el período de tratamiento, indicando que la administración de GH fue el factor responsable de las grandes diferencias observadas entre ambos grupos de pacientes en respuesta a la rehabilitación física.

De acuerdo con los resultados obtenidos es lógico el deducir que la administración de GH juega un papel significativo en la recuperación tras un daño cerebral, independientemente de que exista o no un déficit secretor de la hormona. En este sentido conviene recordar que el ejercicio físico voluntario es un factor que incrementa la neurogénesis y refuerza el aprendizaje y la memoria (Beckinstein et al., 2011). Sin embargo, es difícil encontrar resultados positivos en niños con CP con los que diariamente se realiza un exhaustivo trabajo físico, como nuestros datos también reflejan.

El ejercicio físico es un poderoso estímulo para la secreción de hormona de crecimiento, probablemente a expensas de inducir un aumento del tono noradrenérgico central (Devesa et al., 1992). Se ha demostrado que la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt, una de las vías por las que la GH envía su señal al interior de las células (Costoya et al., 1999), lleva al bloqueo de la neurogénesis inducida por el ejercicio y al de la plasticidad sináptica en ratas (Brael-Jungerman et al., 2009). Existe por tanto la posibilidad de que la ausencia de cambios significativos en niños con CP sometidos a un intenso trabajo físico diario se deba a la existencia de una deficitaria secreción de GH, lo que también parece ocurrir en muchas situaciones de daño cerebral. Ello al margen de que los tests de estimulación que actualmente se usan para valorar esa secreción, no reflejen la existencia de un déficit de GH.

La ceguera es un hallazgo frecuente en los niños con CP. Estudiamos 20 niños con CP ocurrida como consecuencia de prematuridad que llevó a una Leucomalacia Periventricular (11 varones, 9 hembras, edad media $2,05 \pm 1,43$ years) en los que existía una afectación importante de la visión y marcada palidez del nervio óptico. Todos ellos recibieron tratamiento con GH y estimulación visual llevada a cabo con un taquistoscopio (flashes repetitivos de luz blanca, 100-150 ms, llevados a cabo en 10 fases de 1 minuto cada una, a razón de 80 flashes/min; 5 días por semana).

Antes de comenzar el tratamiento e inmediatamente después de finalizar éste se registraron potenciales evocados visuales (VEP). El tratamiento duró 5 ± 2.65 meses. El cese de la estimulación visual y tratamiento con GH se basó en observaciones clínicas (por ejemplo, aparición de interacción visual con el entorno, coger objetos con las manos, fijación de la mirada, etc...).

Los resultados de este estudio (datos no publicados) mostraron que las importantes deficiencias visuales existentes, caracterizadas por ausencia de registro de VEP o una conducción muy retrasada desde la retina al córtex visual, habían sido corregidas al final del período de tratamiento.

Un retraso en la conducción desde la retina a la corteza visual significa una deficiente mielinización de la vía óptica. Si bien ello puede deberse a un retraso en la maduración del SNC, no parece probable que esa fuese la causa en los niños con CP que estudiamos puesto que todos ellos presentaban Leucomalacia Periventricular, una situación en la que la sustancia blanca está consistentemente afectada. Además, muchos de esos niños tenían una edad superior a 2 años, un período de tiempo en el que se considera que el daño cerebral está ya establecido de forma permanente, por lo que es improbable que aparezcan mejorías apreciables. Por otra parte, el daño que afecta a las radiaciones ópticas, tal y como sucede en la Leucomalacia Periventricular, tiene muy mal pronóstico (Hoyt, 2003) por lo que es de esperar que los niños que lo padecen queden con un importante handicap visual.

Un estudio reciente describe que los niveles plasmáticos de GH/IGF-I influyen el

recambio glial en la sustancia blanca (Hua et al., 2009). No está todavía aclarado si el mantenimiento de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) y el recambio de oligodendrocitos en el cerebro adulto cumple alguna función o solamente proporciona una población de células rápidamente reclutables para la reparación de la mielina tras un daño. La proliferación de precursores de oligodendrocitos y el reclutamiento de nuevos oligodendrocitos, capaces de remielinizar, a partir de precursores inmaduros permite la reparación de la mielina tras lesiones desmielinizantes. Tras la desmielinización, la proliferación de OPCs y la diferenciación y supervivencia de oligodendrocitos adultos parecen ser objetivos de regulación por citoquinas y factores de crecimiento.

Existe la posibilidad de que la remielinización que observamos en la vía óptica de los niños CP estudiados, demostrada por las mejorías en las latencias de los VEPs, pudiese deberse al incremento de los niveles de IGF-I tras el tratamiento con GH. Ello no excluye un efecto directo de la GH sobre la mielinización, como recientemente hemos demostrado tras sección del nervio ciático en ratas (P. Devesa et al., 2011, *Muscle & Nerve*, En prensa). Por otra parte, la GH induce la expresión de EGF y su receptor, factores que recientemente se han descrito como implicados en la remielinización del SNC (Gonzalez-Perez & Alvarez-Buylla, 2011).

Por todo ello es razonable el asumir que el tratamiento con GH jugó un papel significativo en la recuperación visual inducida por la estimulación visual específica que utilizamos.

En resumen, el tratamiento con GH parece ser una poderosa herramienta terapéutica para la reparación de daños cerebrales, induciendo la proliferación de precursores neurales, su diferenciación supervivencia y migración hacia zonas dañadas. Aparentemente no existe necesidad de que exista un déficit de GH como para que la hormona pueda ser de utilidad. Sin embargo, los tratamientos en los que se utilice GH como agente reparador deben estar bien programados, deben ser cortos en tiempo y acompañados de una rehabilitación específica. El efecto positivo de la hormona sobre la reparación cerebral permanece en el tiempo tras el cese de los tratamientos.

**Todos los derechos de propiedad intelectual son del autor. Queda prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin autorización expresa del autor.*

© FUNDACIÓN RAMÓN ARECES. Todos los derechos reservados.

**All intellectual property rights belong to the author. Total or partial reproduction of the work without express permission of the author is forbidden.*

© FUNDACIÓN RAMÓN ARECES. All rights reserved.