

# Nuevas estrategias para trasplante de células de bulbo olfativo como terapia en lesión de médula espinal

Romo JE,<sup>1</sup> Loera OF,<sup>1</sup> Adame DR,<sup>1</sup> Estrada A,<sup>1</sup> Díaz JD,<sup>1</sup> Reier PJ<sup>2</sup>

## RESUMEN

El bulbo olfativo es una estructura del sistema nervioso donde los axones lesionados son capaces de regenerarse, y esta propiedad ha entusiasmado ensayos donde se purifica glia envolvente en ratas adultas para trasplantarla y utilizar su potencial regenerador en médulas espinales lesionadas, reportándose que los axones medulares lesionados regeneran a distancia en médulas espinales completamente seccionadas. Así pues, el trasplante de células de bulbo olfativo ha surgido como una terapia prometedora para la reparación de médula espinal traumática y otras enfermedades neurodegenerativas (esclerosis múltiple). Los avances en ciencias básicas de biomedicina, enfocados a esta entidad (lesión de médula espinal y regeneración, han conducido a una variedad de terapéuticas experimentales individualistas, que promueven resultados eficaces en animales de experimentación. Se han sugerido varias propuestas añadidas al protocolo convencional establecido por la Dra. Almudena Ramón Cueto, en los años noventa, como, por ejemplo, la adición de células de Schwann como factores precursores de remielinización, trasplantes de elementos nerviosos y no nerviosos de tejido con alta capacidad potencial para reconstruir circuitos sinápticos, aplicación de NT-3 y GDNF para aumentar el número de neuronas sin promover su diferenciación y otros que proponen el uso de metilprednisolona e interleucina-10 como potentes antiinflamatorios capaces de reducir la pérdida de tejidos del SNC, y con ello ofrecer una protección aditiva ante el mecanismo de lesión.

**Palabras clave:** bulbo olfativo, glia envolvente, células de Schwann, inmunohistoquímica, elementos no neuronales, factor neurotrófico lineal derivado, célula glial (GDNF), metilprednisolona, interleucina-10.

Rev Mex Neuroci 2005; 6(5): 429-434

## New strategies for olfactory bulb cells transplant as therapy in spinal cord injury

### ABSTRACT

The olfactory bulb is a nervous system structure where the injured axons are able to regenerate themselves, and this ability has fostered trials in which unsheathing glia encircling in adult rats is purified to transplant it and to utilize its regenerating potential in spinal cords injured; reports show that injured medullary axons can long-distance regenerate in transacted spinal cords. Thus, the olfactory bulb cell transplant has arisen like a promising therapy for the traumatic spinal cord repair and other neurodegenerative illnesses (multiple sclerosis). The biomedical basic science advances focused to this subject (spinal cord injury and regeneration) has led to a variety of individualistic experimental therapeutics that promotes efficient results in experimental animals. Several proposals have been added to the conventional protocol established by Almudena Ramón Cueto M. D., in the 90's, as, for example, the Schwann's cells addition as precursor factors of remyelination, nervous and non-nervous tissue transplants with a high potential capacity to rebuild synaptic circuits, NT-3 and GDNF application to increase the neuron number without increasing their differentiation and some others that propose the use of methylprednisolone and interleukin-10 as anti-inflammatory capable of reducing the tissue loss of CNS and so offering an additional protection against the injury mechanism.

**Key words:** Olfactory bulb, unsheathing glia, Schwann's cells, immunohistochemistry, non-neuronal elements, glia-derived neurotrophic factor (GDNF), methylprednisolone, interleukin-10.

Rev Mex Neuroci 2005; 6(5): 429-434

1. Escuela de Medicina y Depto. de Investigación Científica del Instituto de Ciencias Biomédicas - Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
2. Mark F. Overstreet Professor of Neuroscience - University of Florida College of Medicine and McKnight Brain Institute. Gainesville FL.

Correspondencia:

Dr. Jesús Eduardo Romo

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez-Instituto de Ciencias Biomédicas. Departamento de Ciencias Médicas. Anillo Envolvente del Pronaf y Estocolmo s/n C. P. 32310. Tel. y fax: (656) 688-1855 Cd. Juárez, Chihuahua, México.

E-mail: [jesusromo@salud.gob.mx](mailto:jesusromo@salud.gob.mx)

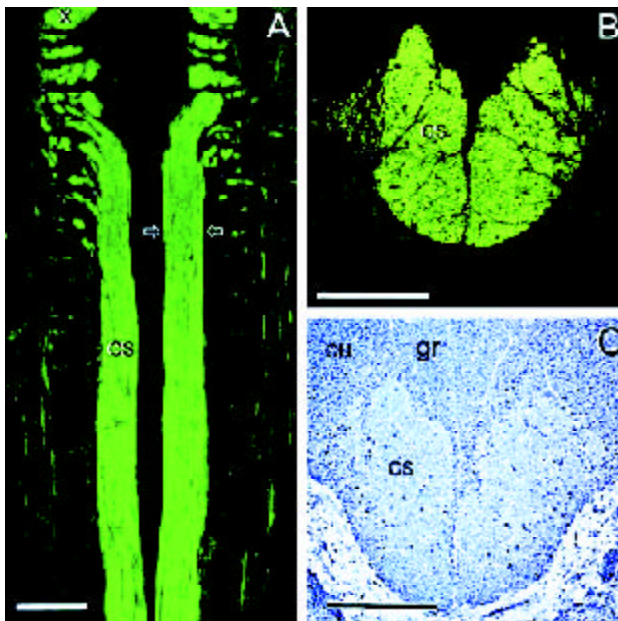
## INTRODUCCIÓN

### Información transmitida por neuronas

Las neuronas son las células del sistema nervioso encargadas de transmitir información de unas zonas a otras por medio de sus axones. Así, recogen información de nuestro cuerpo y del exterior que transmiten a otras neuronas situadas en la médula espinal y tronco del encéfalo, quienes, a su vez, por medio de sus axones, informan a otros centros nerviosos y al cerebro. Las órdenes generadas por el cerebro viajan por los axones de otras neuronas siguiendo la ruta inversa, atraviesan la médula espinal para enviar la información a los músculos y otras estructuras. La médula espinal se comporta, pues, como un potente conductor formado por una multitud de axones que transmiten impulsos eléctricos hacia el cerebro (vías ascendentes) y órdenes del cerebro a estructuras efectoras (vías descendentes).<sup>1</sup>

### Lesión axonal

Cuando la médula espinal sufre una agresión se interrumpen las vías nerviosas en el lugar de la lesión y los axones dañados ya no pueden transmitir impulsos eléctricos. En los mamíferos adultos, estos axones medulares lesionados son incapaces de regenerar y no pueden reconectarse con las estructuras a las que informaban antes de la lesión, provocando una pérdida de la sensibilidad y una parálisis permanente e irreversible por debajo del nivel de la lesión.<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Tomado de J Neurosci 1998 Dic 15; 18(24): 10514-24. Regeneración de axones corticoespinales de rata adulta, inducida por trasplante de células olfativas envolventes.

En la figura 1 podemos observar en A el tracto corticoespinal (cs) normal de la rata, mientras que en B su disposición ventral en corte axial y en C fascículos posteriores sensitivos (cu, gr). Mientras que en la figura 2 podemos visualizar las características morfológicas poslesión (les).

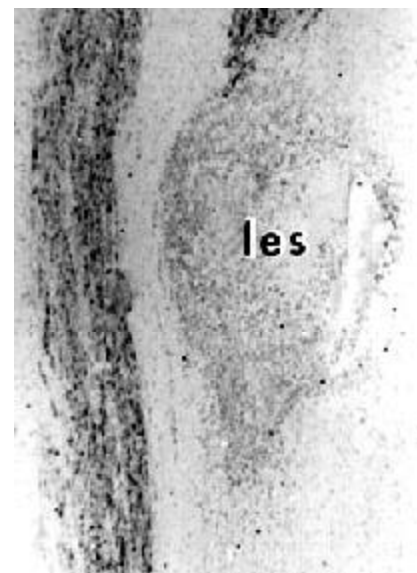
### El bulbo olfativo y su regeneración

El bulbo olfativo es una estructura del sistema nervioso donde los axones lesionados son capaces de regenerar y reconectarse. Esto se debe a que están rodeados por un tipo especial de célula, la glia envolvente, que crea las condiciones necesarias para que los axones olfativos lesionados puedan regenerarse. Se ha purificado la glia envolvente de bulbos olfativos de ratas adultas para trasplantarla y utilizar su potencial regenerador en médulas espinales lesionadas y se ha reportado mediante ensayos inmunohistoquímicos, que gracias al trasplante de glia envolvente, los axones medulares lesionados regeneraran a distancia (Figura 3) en médulas espinales completamente seccionadas.<sup>2-7</sup>

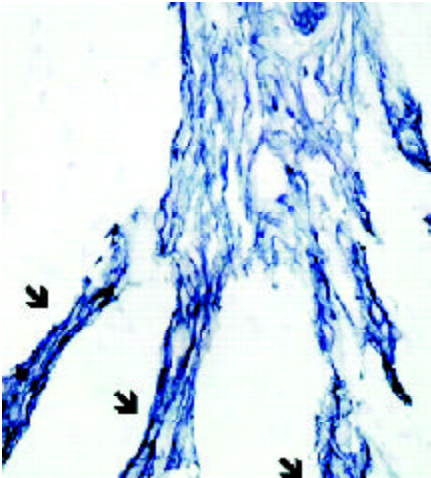
### OBJETIVOS

El primer objetivo de nuestro trabajo es resaltar brevemente la modalidad terapéutica experimental, que ha permitido la regeneración de axones lesionados y recuperación funcional de animales experimentales en lesiones de médula espinal con uso de trasplante de células de bulbo olfativo.

En segunda instancia, revisar, analizar y establecer un juicio sobre las nuevas propuestas ideadas



**Figura 2.** Tomado de J Neurosci 1998 Dic 15; 18(24): 10514-24. Regeneración de axones corticoespinales de rata adulta, inducida por trasplante de células olfativas envolventes.



**Figura 3.** Tomado de J Neurosci 1998 Dic 15; 18(24): 10514-24. Regeneración de axones corticoespiniales de rata adulta, inducida por trasplante de células olfativas envolventes.

por los investigadores en los últimos años para mejorar sus estudios experimentales.

Y, en tercer punto, dejar a la expectativa una hipótesis que reúna estas modalidades de forma conjunta para la idealización de un protocolo experimental refortalecido.

## NUEVAS ESTRATEGIAS

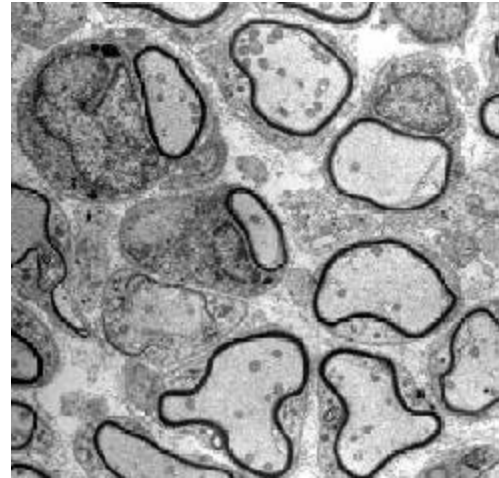
### Células de Schwann

Estudios anatómico-fisiológicos llevados a cabo en roedores trasplantados con células de bulbo olfativo (glia envolvente) y apoyados con células de Schwann como factores precursores,<sup>8</sup> reportan que la regeneración axonal y restauración de la conducción a través del sitio de la lesión es más viable, puesto que hay una capacidad de reparación de fibras y remielinización más eficiente.<sup>8,9</sup>

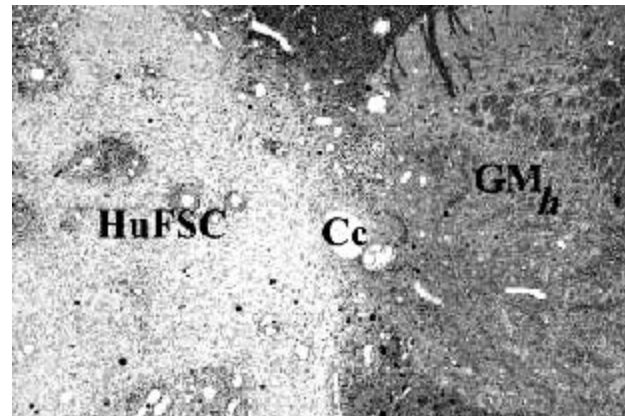
En el 2003 Jeffrey y cols., con la metodología habitual para trasplante de células gliales (cultivo celular, inmunohistoquímica e histología, citometría de flujo y adición del complemento C3), realizaron implantes de células altamente purificadas y manipuladas transgénicamente expresando el gen  $\alpha 1,2$  fucosil-transferasa y cuatro semanas después se evidenció remielinización por arriba de 60% de los sitios inoculados, mientras que en los controles la posibilidad de remielinización fue nula. Esta evidencia fue llevada a cabo mediante estudios inmunohistoquímicos, que prometen avances en la modalidad de xenotrasplante. En la figura 4, podemos observar un corte ultraestructurado que muestra axones remielinizados a partir de núcleos de trasplante.

### Elementos nerviosos y no nerviosos

Sin duda, una terapia de trasplante ideal debería contar con un soporte de elongación axonal efi-



**Figura 4.** Tomado de J Neurosci 2004 Abr 15; 21(4): 441-9. Precursores neurales como fuente de células para reparar la desmielinizada médula espinal.

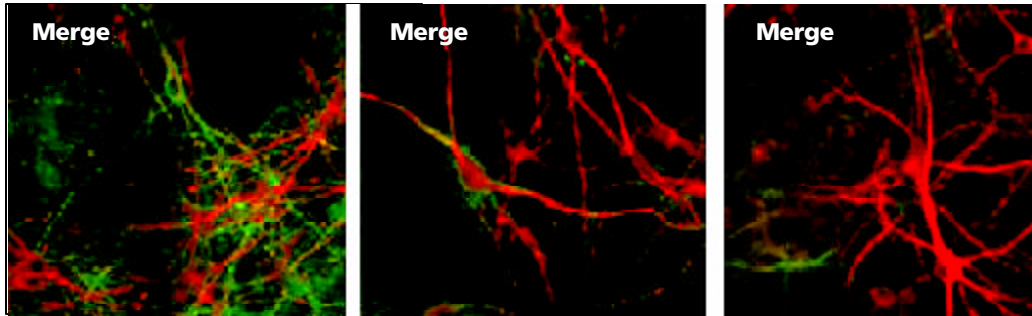


**Figura 5.** Tomado y modificado de NeuroRx 2004; 1: 424-51. Estrategias de trasplante celular para médula espinal lesionada y neurobiología transferencial.

ciente con alta capacidad de restauración en el SNC adulto, remielinización inmediata en procesos de lesión, facilidad de migración de elementos a través del parénquima del SNC, etc.

Con la ayuda de la neurobiología es factible el trasplante de elementos nerviosos y no nerviosos de tejido con potencial que promueva restaurar nervios dañados y reconstruir circuitos sinápticos, así como el reemplazo de neurona o glia.<sup>9</sup> Algunas de estas estrategias se han puesto en marcha ya en los ensayos experimentales, e incluso hay experiencias clínicas en cuanto a su aplicación en reparación y regeneración celular en lesión de médula espinal.<sup>9</sup>

Cuando se ha hecho el trasplante celular es factible ofrecer un soporte con apoyo de elementos no neuronales (injertos del tejido fino periférico de nervio, glia olfatoria, macrófagos activados, células del estroma, precursores formadores de mielina del oligodendrocito y tejido fino fetal de la médu-



**Figura 6.** Tomado y modificado de *Neurosci* 2005 Ene; 191(1): 65-76. Neurotrofina y ligandos de la familia GDNF, promueven sobrevivencia y cambio en la vulnerabilidad de la excitotoxicidad de las neuronas derivadas de las células troncales embrionarias de múridos (roedores).

la espinal), con el fin de proveer condiciones más óptimas para su desarrollo.<sup>9</sup>

Un ejemplo de ello es el trasplante de células neuroepiteliales germinales y vasos del tejido de cordón espinal fetal humano a ratas, que evidencia así la posibilidad de trasplantar no sólo tejido neuronal. En la figura 5 podemos observar una sección transversa del cordón espinal de rata adulta donde se utilizó remanente tisular (HuFSC), posterior al mecanismo de lesión; esta imagen demuestra entonces la viabilidad que se puede obtener con trasplante de tejido no neuronal.

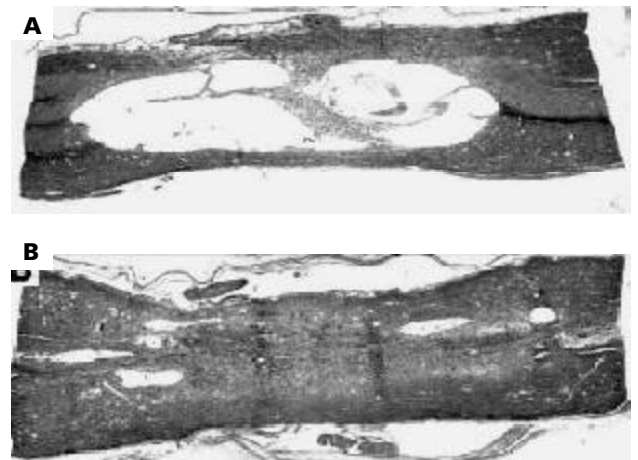
### **Factor neurotrófico lineal derivado de célula glial (GDNF) y Neurotrofina- 3 (NT3)**

La manipulación genética ha jugado un papel principal en los estudios convencionales con el fin de encontrar mejores resultados. En un estudio reciente Lee y cols.<sup>10</sup> han probado la capacidad de modificar genéticamente y de manera pluripotencial las células de bulbo olfativo con el fin de estimular la secreción de altos niveles de GDNF, y con ello mejorar perceptiblemente la recuperación después de lesión de la médula espinal promoviendo la diferenciación de células madre hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos directamente.<sup>10,11</sup>

En forma *in vitro* (mediante cultivos celulares y diferenciación de células madre, preparación de RNA, uso de PCR, inmunoblotting, etc.), se han examinado y comprobado con ensayos inmunohistoquímicos y cuantificación de células neuronales (Figura 6), los efectos de supervivencia dados por el NT-3 y GDNF, donde esta adición aumenta el número de neuronas cultivadas de forma gradual, sin promover su diferenciación. Traduciendo con ello un éxito en cuanto a la replicación neuronal directa.<sup>10</sup>

### **Uso de metilprednisolona (MP) e interleucina-10 (IL-10)**

Se ha propuesto el uso de metilprednisolona e interleucina-10<sup>12</sup> como potentes antiinflamatorios moleculares, capaces de reducir la pérdida de tejidos del SNC y con ello ofrecer una protección aditiva ante el mecanismo de lesión.



**Figura 7.** Tomada y modificada de *J Neurotrauma* 2004 Sep; 21(9): 1223-39. El trasplante de células de Schwann y glia olfativa envolvente después de la lesión de la médula espinal, ¿hace que el pretratamiento con metilprednisolona e interleucina-10 aumente la recuperación?

La combinación de trasplante de células de bulbo olfativo junto con células de Schwann (en animales de experimentación con lesiones contusas de médula espinal torácica) y la adición de MP 30 MG/kg IV a los cinco minutos, dos horas y cuatro horas después de la lesión, así como IL-10 30 mg/kg i.p. a los 30 minutos, mejoran el volumen de tejido fino reestructurado (9 mm) en comparación con controles de lesión sin este tratamiento (evidencia 12 semanas después).<sup>12</sup>

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos por esta propuesta; en A observamos la muestra de control y su lesión sin tratamiento, mientras que en B es evidente la mejoría ante el tratamiento con MP e IL con las modalidades de trasplante establecidas.

### **DISCUSIÓN**

Hemos revisado el uso de nuevas variantes terapéuticas que presumen una gama de resultados prometedores ante la carrera por establecer la mejor propuesta en esta entidad experimental. ¿Cuál propuesta será la más efectiva?, pregunta obligada que compromete un análisis difícil.

En cuanto al uso de células de Schwann es indudable su capacidad de reparación y quizá tenga un impacto próximo en controles humanos. Los estudios publicados presumen resultados positivos hasta por encima de 90%, que incluso hay cuestiones en cuanto a su uso en reparaciones de otra índole.

La disposición de elementos no nerviosos a los protocolos ya establecidos genera un gran debate en la disposición de estándares convencionales. Es bien sabido que los elementos de tejido fetal generan buenos resultados en cuanto a la terapia celular, pero ¿qué hay acerca de manipular individualmente elementos como tejido fino periférico de nervio, macrófagos activados, células estrómicas, precursoras formadoras de mielina del oligodendrocito, tejido fino fetal de médula espinal, etcétera? Sin lugar a dudas los avances en neurobiología contribuirán a desarrollar protocolos de fácil manipulación en este sentido para mejores resultados.

Las neurotrofinas promueven la supervivencia neuronal en lesiones por necrosis y juegan un papel importante en rasgos de crecimiento celular. Los estudios que utilizaron un pretratamiento con NT-3 y NT-4, y aplicación de Gf6976, una proteína quinasa C inhibitoria, demostraron la inhibición del receptor intrínseco tiroxina quinasa, mejorando perceptiblemente la recuperación después de la lesión.

Otra protección aditiva de forma inmediata ante una lesión espinal es el uso de MP e IL-10. Sin duda, esta medida farmacológica evita un peor pronóstico contra el daño establecido. Los investigadores indagan en su uso en el trasplante de células de bulbo olfativo reforzadas con células de Schwann como medida de soporte, y hemos revisado que los resultados sean muy provechosos.

## COMENTARIO FINAL

De cualquier forma, las ideas presentadas en esta revisión presumen excelentes resultados en vías a mejorar el protocolo de investigación y dejar su aportación en esta rama de la medicina y ser directamente precursores de futuras investigaciones.

Algo que dejamos a la expectativa y a manera de hipótesis es lo siguiente: si hubiera posibilidad de complementar un ensayo experimental que reuniera estas posibilidades en conjunto... ¿evidenciaría mejores resultados? Sin duda, creemos que sí.

## AGRADECIMIENTOS

A nuestra Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, por ofrecer todo lo posible en la realización de este trabajo. Por el apoyo, interés, revisión y disposición de material científico, agradecemos infinitamente a:

Dra. Almudena Ramón Cueto, Directora de la Unidad de Regeneración Neural del Instituto de

Biomedicina de Valencia; Paul J. Reier, Ph.D, Profesor de Neurociencias de la University of Florida College of Medicine and McKnight Brain Institute; Jeffery D. Kocsis, Ph.D, de Yale University School of Medicine, Neuroscience Research Center; Daniel Damien Pearse, del Department of Cell Biology and Anatomy and Neurological Surgery, de The Miami Project to Cure Paralysis, University of Miami School of Medicine, Miami FL, USA; Dr. Jorge Aragón Lomas, Neurocirugía, Centro Médico de Especialidades de Ciudad Juárez.

## REFERENCIAS

1. Ramón y Cajal S. *History of neuroscience No. 5. Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system.* Corsi P, Jones EG, Shepherd GM, De Felipe J (Eds.); May RM (Transl.) New York: Oxford University Press; 1991, p. 738.
2. Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M. *Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells.* *Neuroscience* 1992; 47(1): 213-20.
3. Ramón-Cueto A, Valverde F. *Olfactory bulb ensheathing glia: a unique cell type with axonal growth-promoting properties.* *Glia* 1995; 14(3): 163-73.
4. Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M. *Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants.* *Exp Neurol* 1994; 127(2): 232-44.
5. Ramón-Cueto A, Ávila J. *Olfactory ensheathing glia: properties and function.* *Brain Res Bull* 1998; 46(3): 175-87.
6. Ramón-Cueto A, Plant GW, Ávila J, Bunge MB. *Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants.* *J Neurosci* 1998; 18(10): 3803-15.
7. Li Y, Field PM, Raisman G. *Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells.* *J Neurosci* 1998; 18(24): 10514-24.
8. Kocsis JD, Akiyama Y, Radtke C. *Neural precursors as a cell source to repair the demyelinated spinal cord.* *J Neurotrauma* 2004; 21(4): 441-9.
9. Reier PJ. *Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology.* *NeuroRx* 2004; 1: 424-51.
10. Lee CS, Tee LY, Dusenbery S, Takata T, Golden JP, Pierchala BA, Gottlieb DI, Johnson EM Jr, Choi DW, Joy Snider B. *Neurotrophin and GDNF family ligands promote survival and alter excitotoxic vulnerability of neurons derived from murine embryonic stem cells.* *Exp Neurol* 2005; 191(1): 65-76.
11. Li C, Li L, Zhe-Yu C, Li-Mei W, Jun-Li Y, Hai-Yan Q, Chang-Lin L, Cheng H. *Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair.* *Brain* 2004; 127(3): 535-49.
12. Pearse DD, Marcillo AE, Oudega M, Lynch MP, Wood PM, Bunge MB. *Transplantation of Schwann cells and olfactory ensheathing glia after spinal cord injury: does pretreatment with methylprednisolone and interleukin-10 enhance recovery?* *J Neurotrauma* 2004; 21(9): 1223-39.

13. Jike Lu, et al. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain* 2002; 125: 14-21.
14. Barnett SC. Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? *J Neurotrauma* 2004; 21(4): 375-82.
15. García-Alias G, López-Vales R, Flores J, Navarro X, Verdu E. Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 2004; 75(5): 632-41.
16. Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *J Comp Neurol* 2004; 473(1): 1-15.
17. Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats. *J Anat* 2004; 204(1): 57-67.
18. Ramón-Cueto A, Santos-Benito FF. Cell therapy to repair injured spinal cords: olfactory ensheathing glia transplantation. *Restor Neurol Neurosci* 2001; 19(1-2): 149-56.
19. Fry EJ. Central nervous system regeneration: mission impossible? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28(4): 253-8.
20. Ramón-Cueto A, Ávila J. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* 1998; 46(3): 175-87.
21. Ramón-Cueto A, Plant GW, Ávila J, Bunge MB. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 1998; 18(10): 3803-15.
22. Li Y, Field PM, Raisman G. Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 1998; 18(24): 10514-24.
23. Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 1994; 127(2): 232-44.
24. Ramón-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Glial cells from adult rat olfactory bulb: immunocytochemical properties of pure cultures of ensheathing cells. *Neuroscience* 1992; 47(1): 213-20.

