Universidad Zaragoza
1542

TRABAJO FIN DE GRADO

GLÍA ENVOLVENTE OLFATORIA:

RESULTADOS E IMPLEMENTACIÓN DE SU TRASPLANTE EN LESIONES MEDULARES

OLFACTORY ENSHEATHING GLIA:

RESULTS AND IMPLEMENTATION FOR TRANSPLANT IN SPINAL INJURIES

Autora:

Remedios Ayuso Pedreño

Director:

Dr. Javier Gracia Llanes

Facultad de Medicina: Curso 2019/2020

Departamento de Anatomía e Histología Humanas

ÍNDICE

1. RESUMEN 1
2. SUMMARY 2
3. INTRODUCCIÓN 3
3.1 El sistema nervioso 3
3.2. Lesiones que afectan a la transmisión del impulso nervioso 5
3.3 Mecanismos de lesión y reparación en la médula espinal 7
3.4 Cicatriz glial: moléculas inhibitorias implicadas 9
3.5 Glía envolvente olfatoria (OEG) 12
3.5.1 Origen y localización 12
3.5.2 Características morfológicas y ultraestructurales de las células de OEG 14
3.5.3 Marcadores de OEG. Similitudes y diferencias con astrocitos y células de Schwann 16
3.5.4 Obtención y fuente de OEG 19
4. MATERIAL Y MÉTODOS 21
5. DESARROLLO 22
5.1 Procedimiento previo y trasplante de OEG 22
5.2 Resultados del trasplante de OEG para el tratamiento de lesiones medulares 23
5.3 Estrategias de mejora complementaria a las células de OEG 26
5.3.1 Cultivo estable de OEG. Las células TEG3 26
5.3.2 OEG y telomerasa 27
5.3.3. Nanofibras de PLA para facilitar la migración de OEG 28
5.3.4 Coadyuvancia en el trasplante de OEG 30
5.4 Tratamiento seguro de pacientes con OEG 30
6. CONCLUSIONES 32
7. BIBLIOGRAFÍA 33

1. RESUMEN

La incapacidad e irreversibilidad que producen las lesiones medulares genera el interés por tratar de establecer un mejor pronóstico y tratamiento para estos pacientes. Para ello, es necesario conocer los mecanismos establecidos tras la lesión medular. Normalmente, estos mecanismos inhiben la capacidad regenerativa axonal y evita que las posibles terapias que pudieran revertir estos cambios sean eficaces. Las células de glía envolvente olfatoria (OEG) ayudan a los axones del nervio olfatorio a alcanzar el bulbo olfatorio en el sistema nervioso central. Estas células se han utilizado experimentalmente para el tratamiento de lesiones, gracias a su actividad regenerativa y reparativa que tienen sobre el nervio olfatorio. El procedimiento que se utiliza consiste en extraer las OEG de la mucosa o bulbo olfatorio, cultivarlas y trasplantarlas en la zona de la lesión.

El objetivo de esta revisión es mostrar la metodología utilizada para la obtención de OEG, su trasplante y los resultados que se han obtenido en diferentes especies. Por otro lado, se analiza la utilización de coadyuvantes para que sea efectivo el trasplante de OEG y las estrategias que pudieran ser complementarias y potenciadoras de su actividad. Finalmente, se hace mención a los últimos trabajos que han utilizado esta terapia para tratar lesiones medulares en pacientes y las noticias contradictorias que se tiene sobre su utilización.

Palabras clave: glía envolvente olfatoria, TEG3, inhibición de crecimiento axonal, excitoxicidad, regeneración axonal, lesión medular, telomerasa, nanofibras de PLA

2. SUMMARY

The irreversible disability from spinal cord injuries creates an interest in improving prognosis and treatment for these patients. In order to achieve this, it is necessary to understand the mechanism behind the injury. Typically, these mechanisms inhibit axonal regenerative capacity and prevent potential therapies that could reserve these changes from being effective. The olfactory ensheathing glia (OEG) support the olfactory nerve axons reach the olfactory bulb within the central nervous system. These cells have been used experimentally for treatment of lesions, due to their regenerative and reparative activity of olfactory nerve. The procedure consists of extracting the OEG from mucosa or the olfactory bulb, cell cultures and transplantion it to the injured area.

The objective of this review is to show the methodology used to obtain OEG, its transplantion and the results that have been obtained in different species. On the other hand, the effectiveness of adjuvants for the transplantation of OEG is also analyzed, alongside strategies to help complement and enhance their activity. Finally, the latest research in this field is discussed. This includes contradictory evidence limiting its use.

Key words: olfactory ensheathing glia, TEG3, axonal growth inhibition, excitotoxicity, axonal regeneration, spinal cord injury, telomerase, PLA nanofibres

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El sistema nervioso

El sistema nervioso es la estructura más compleja de nuestro organismo. A nivel médico, tiene una gran importancia por su función y la trascendencia que conlleva una lesión en él. Esto le convierte en el epicentro de la investigación actualmente.

La unidad estructural y funcional del sistema nervioso es la neurona. La neurona está compuesta por un soma o cuerpo neuronal y sus prolongaciones citoplasmáticas o neuritas. Estas se clasifican en dos tipos: las dendritas, que son ramificaciones cortas que reciben estímulos de otras neuronas y los axones, de menor número, pero de mayor longitud que las dendritas. A través del axón puede viajar largas distancias el impulso nervioso. Las neuronas transmiten la información entre ellas mediante sinapsis. Esta transmisión se realiza, normalmente, desde las dendritas hacia el axón estableciendo una cadena de transmisión (neurona presináptica-hendirura sináptica-neurona postsináptica) hasta que el impulso nervioso produce una respuesta determinada en otra neurona o en una diana muscular o glandular.

De esta manera, el sistema nervioso podría definirse como un conjunto de órganos y estructuras cuya función principal es captar estímulos, procesarlos y elaborar una respuesta coordinada. El sistema nervioso abarca todo el organismo clasificándose en sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP) y sistema nervioso entérico (SNE).

El SNC presenta neuronas encargadas de transmitir, procesar e interpretar la información que proviene del medio interno y externo, producir órdenes motoras y estimular la actividad glandular. Su función principal es el control de las actividades voluntarias e involuntarias. El tejido nervioso que lo forma se puede clasificar en dos: la sustancia gris, compuesta por los cuerpos o somas de las neuronas y la neuroglia; y la sustancia blanca, formada principalmente por los axones mielínicos, encargados de transportar los impulsos nerviosos hacia o desde la sustancia gris (1).

Anatómicamente, el SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo se divide en cerebro, diencéfalo, tronco cerebral y cerebelo. La médula espinal se comunica con el encéfalo a través del tronco cerebral y se localiza dentro de la columna vertebral. Se compone de 31 segmentos donde se originan los de nervios espinales que luego se bifurcan. En la médula espinal encontramos la salida de los nervios motores y la entrada de los sensoriales que transmiten señales, a través de vías aferentes y eferentes, entre el encéfalo y los nervios periféricos (1).

El SNP carece de estructuras de protección como las meninges o los huesos. Está formado por nervios y ganglios nerviosos y estos a su vez por neuronas y células gliales. La función principal del SNP es conectar los estímulos que recibe el cuerpo: externos, internos y propioceptivos, con el SNC, y a éste a su vez con los órganos, aparatos o sistemas del organismo que controla.

Desde el punto de vista funcional, el SNP puede dividirse entre sistema somático, encargado de llevar la información sensorial y motora al SNC; y sistema autónomo, a su vez dividido en simpático y parasimpático, encargado de regular las funciones

corporales involuntarias como la tensión arterial, la frecuencia cardiaca, el flujo sanguíneo, etc. (1).

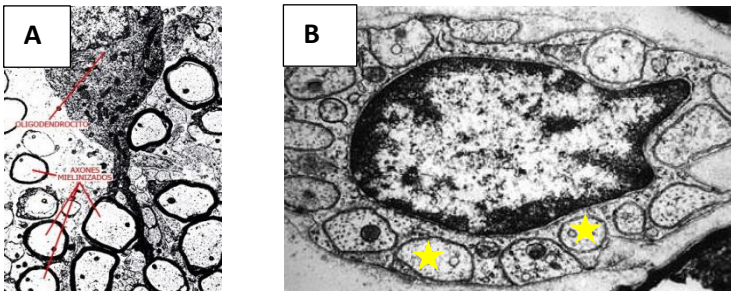
Ambos sistemas, SNC y SNP, además de su componente neuronal, están formados de numerosas células gliales o neuroglia. Estas células rodean y proporcionan soporte estructural, metabólico y nutricional a las neuronas, pero también regulan el crecimiento y desarrollo de los axones y las dendritas. A diferencia de las neuronas, estas células no forman contactos sinápticos ni tienen axones, pero juegan un papel importante en la transmisión sináptica. Las células gliales se clasifican según su ubicación dentro del sistema nervioso. Las células gliales del SNC es un grupo formado por las células ependimarias, los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos. En el SNP destacan las células de Schwann y las células satélite, mientras que en el SNE destaca la glía entérica (1).

En el SNC, las células ependimarias se localizan tapizando los ventrículos laterales y el canal central de la médula espinal donde facilitan el movimiento del líquido cefalorraquídeo. Los astrocitos, sin embargo, son células más abundantes y su nombre hace referencia al aspecto estrellado que presentan. Están implicadas en numerosas funciones como suministro de nutrientes a las neuronas, soporte estructural, reparación, regeneración, aislamiento y retirada de neurotransmisores del medio. La microglía, por otro lado, actúa fagocitando y secretando citoquinas antiinflamatorias tras lesiones que implican un daño neuronal. Por último, los oligodendrocitos forman las vainas de mielina alrededor de los axones. Estas vainas crean una capa aislante de componente proteico y graso cuya función es proporcionar una conducción más eficiente de los impulsos nerviosos (Figura 1) (1).

Por otro lado, en el SNP destacan las células satélite, cuya principal función es estructural y metabólica en los ganglios sensoriales simpáticos y parasimpáticos; y las células de Schwann, que desempeñan las mismas funciones que la glía del SNC (Figura 1). Estas células se sitúan, como los astrocitos, entre las neuronas; fagocitan en procesos de lesión o inflamación, como la microglía, y forman mielina recubriendo los axones del SNP, como los oligodendrocitos (1).

Por último, la glía entérica en el SNE envuelve los cuerpos neuronales y los axones, modifica el tamaño de los vasos sanguíneos y, según algunos estudios, realizan funciones semejantes a los astrocitos (2).

Figura 1. **Micrografía de un oligodendrocito y una célula de Schwann mediante microscopía electrónica de transmisión;** A: Oligodendrocito y axones mielinizados en el SNC; B: Células de Schwann rodeando axones amielínicos en el SNP (estrellas). Modificado de (3)



Por tanto, las células gliales son necesarias para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso al regular múltiples procesos. La generación y trasmisión del impulso nervioso se debe a las neuronas, pero son necesarias las células gliales para que este viaje adecuadamente. Alteraciones que puedan dañar la trasmisión del impulso nervioso llevará, consecuentemente, la imposibilidad de comunicación en el sistema nervioso.

3.2. Lesiones que afectan a la transmisión del impulso nervioso

Las lesiones del SNC pueden dañar el encéfalo o la médula espinal. Si la lesión es leve, el sistema nervioso puede recuperarse completamente. Pero si la lesión es grave, puede causar discapacidad permanente e incluso la muerte. Las lesiones que afectan a la médula espinal producen daños en las fibras nerviosas. Esto afecta a la capacidad de la médula para enviar y recibir mensajes del cerebro hacia y desde los sistemas corporales que controlan las funciones sensoriales, motoras y autónomas. Por tanto, este tipo de lesión suele causar cambios permanentes en la fuerza, en la sensibilidad y parálisis por debajo del nivel de la lesión.

Las lesiones medulares presentan una incidencia de al menos 500.000 casos al año (relación 2:1 hombres-mujeres) y una probabilidad de supervivencia de 2 a 5 veces menor para estos pacientes, alcanzando peores tasas en aquellos países con una menor renta (4).

La etiología de las lesiones medulares puede ser variada: congénita, traumatismos, infecciones, tumores o secundarias a enfermedades sistémicas. En el 90% de los casos se producen como consecuencia de eventos traumáticos: accidentes automovilísticos, caídas de altura, heridas por arma de fuego o prácticas deportivas (4).

La localización y características del SNC, en comparación con SNP, hace que disminuya la posibilidad de reparación ante estas lesiones. Esto es debido a varias causas. Por un lado, las cavidades óseas que lo envuelven para protegerlo, producen mayor compresión si se produce inflamación a este nivel. Por otro lado, la necesidad de grandes cantidades de flujo sanguíneo conlleva cuadros de isquemia de manera rápida.

Aunque las células gliales y la matriz extracelular (MEC) que componen el SNC difieren del SNP, las lesionales evolucionan de forma similar. Ante una lesión en el SNC y/o SNP, independientemente de su etiología (aplastamiento, tracción, compresión), se produce un fenómeno de degeneración (con alguna excepción en SNP). Debido a la lesión, el axón se desprende del soma generando un fenómeno de fagocitosis y pérdida del axón distal (5). Este proceso, denominado degeneración Walleriana, es común en ambos sistemas nerviosos pero el proceso de recuperación es lo que diferenciará las repercusiones que puedan establecerse. Tras la degeneración Walleriana, las células gliales del SNC no tienen capacidad suficiente para regenerar estas largas vías neuronales. Esto conlleva una falta de recuperación distal y la activación de mecanismos fisiopatológicos que impiden la reconexión de

fascículos espinales dañados como fibras nerviosas motoras, propioceptivas, táctiles y el resto de funciones sensoriales (5,6). Por este motivo, las lesiones medulares tienen una gran repercusión para el paciente y conlleva un gasto económico asociado a la discapacidad que provoca un empeoramiento de la situación económica personal y familiar.

La incapacidad para poder regenerar las lesiones medulares provoca sintomatología como dolor crónico, signos de depresión, riesgo de enfermedades secundarias (trombosis venosa profunda, úlceras de decúbito e infecciones) y la necesidad de programas multidisciplinares, como rehabilitación y fisioterapia, para evitar atrofias secundarias (4).

Contrariadamente, en el SNP, el sistema de reparación ante lesiones a través de la actividad de sus células gliales hace que difiera mucho del SNC en cuanto a su trascendencia. La afectación del tejido conjuntivo que envuelve a los nervios periféricos (epineuro, perineuro y endoneuro) y las células de Schwann, con su capacidad de formación mielínica, serán los factores determinantes para la posible reparación.

Una clasificación de las lesiones de los nervios periféricos más utilizada se basa en los trabajos de Herbert Seddon (1903–1977), un cirujano ortopédico inglés. El estableció tres tipos de lesiones: neuropraxia, axonotmesis y neurotmesis.

Axonopraxia o neuropraxia

La neuropraxia implica una pérdida en la conducción nerviosa consecuentemente al corte ocasionado. Únicamente se produce fragmentación de la vaina de mielina en los axones (desmielinización focal). No hay daño estructural en el nervio ni en el tejido conjuntivo y solo aparecen signos inflamatorios con edema. Las células de Schwann no se ven afectadas por lo que habrá un proceso de regeneración espontánea (Figura 2). Es el único tipo de lesión periférica donde no existe el fenómeno de degeneración Walleriana (5,7).

Axonotmesis

En la axonotmesis la lesión nerviosa conserva la continuidad del nervio. Sin embargo, hay una degeneración de los axones y las vainas mielínicas pero el tejido conjuntivo se mantiene intacto (Figura 2). La zona proximal lesionada también recibe un proceso de degeneración denominada retrógrada o primaria.

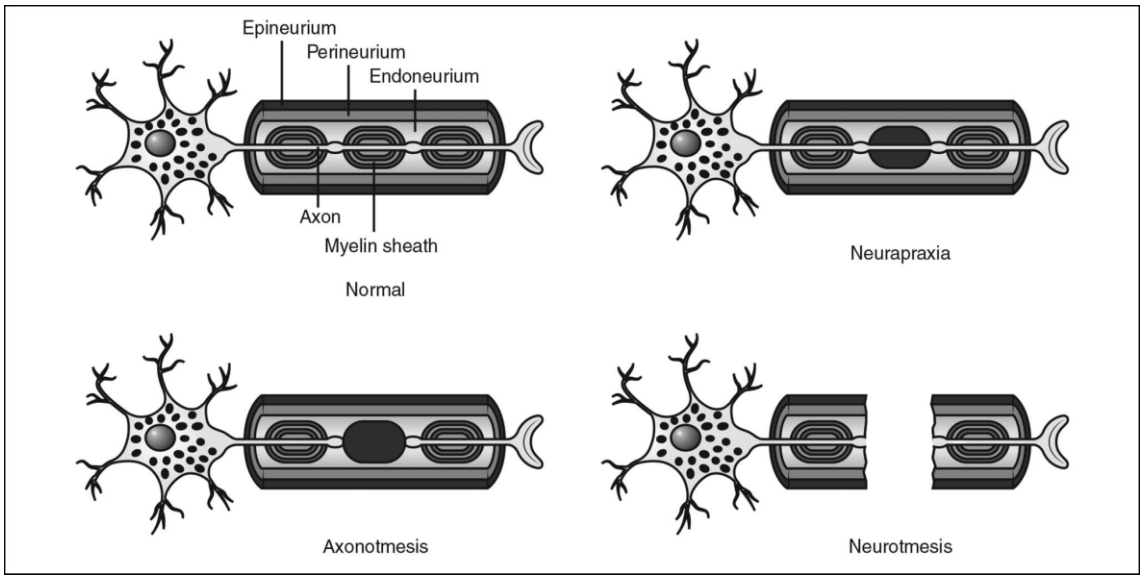
Tras la degeneración Walleriana, las células de Schwann bajo la lesión forman un tubo. Estimuladas por brotes regenerativos del complejo axónico, comienzan a dividirse y rellenar los espacios que ocupaban los axones lesionados reestableciendo la funcionalidad de estos (5,7). La recuperación suele ser satisfactoria aunque, en ocasiones, se requiere una neurolisis: intervención quirúrgica para escindir de la cicatrización establecida.

Neurotmesis

La neurotmesis implica una lesión del nervio parcial o completa (Figura 2). Se produce tanto la degeneración Walleriana como la del tejido conjuntivo. Existe una interrupción

en el tubo formado (células de Schwann) o disrupción completa del complejo axónico, lo que conlleva la imposibilidad para regenerar los axones de manera espontánea. Se produce al final una pérdida completa de la función nerviosa (sensitiva y motora). Macroscópicamente el nervio puede mantener un tracto continuo, pero carece de funcionalidad. Posteriormente, pueden aparecer fenómenos secundarios como el neuroma: degeneración de tejido neuronal y formación de tejido fibroso acompañado de dolor localizado (7). En estos casos es necesaria su intervención quirúrgica mediante suturas fasciculares o epineurales para intentar su recuperación.

Figura 2. **Clasificación de lesiones en nervios del SNP.** Nótese la implicación de tejido conjuntivo y de la vaina de mielina en su posible regeneración (8).



Por tanto, en el SNP la reparación en lesiones axonales se produce, ya sea de manera espontánea como en las neuropraxias, en la mayoría de axonotmesis o de forma quirúrgica en las neurotmesis. Esto hace que este tipo de lesiones no sea tan limitantes e incapacitantes para el paciente teniendo un pronóstico favorable.

En el caso del SNC, la actividad de las células gliales ante lesiones medulares es limitada. La aparición de numerosos fenómenos secundarios a esta y la incapacidad para poder revertirlos afecta a la hora de poder reparar el daño axonal. Por este motivo, es necesario conocer los mecanismos que se establecen en este tipo de lesiones para poder realizar un abordaje terapéutico.

3.3 Mecanismos de lesión y reparación en la médula espinal

La actividad que el SNC desempeña a través de sus largas vías sensoriales y motoras y la incapacidad que tiene para la reparación, produce consecuencias de gran trascendencia en el paciente lesionado. Esto se debe a una pérdida de control supraespinal de las funciones motoras, sensitivas y autónomas por debajo de la lesión que conlleva un daño neuronal permanente con nula o casi nula autorecuperación. Sin

embargo, la capacidad regenerativa mejora cuando los axones lesionados son cortos y no abarcan grandes distancias (5,6).

Cuando se produce una lesión medular, hay un daño primario con extensión de la muerte neuronal y glial a causa de la excitotoxicidad, la isquemia y la disfunción metabólica producida. El estrés oxidativo y la liberación de radicales libres generan un daño secundario que parece ser el causante de la muerte neuronal posterior a la lesión (9).

Los mecanismos de lesión y reparación medular puede dividirse en tres fases secuenciales (10):

1º Fase aguda

Presenta una duración de 8 a 24h. En ella se produce muerte neuronal y fenómenos de degeneración Walleriana. La actividad de los macrófagos, ante este proceso, se prolonga unas 48h poslesión, generando un ambiente anaerobio y produciendo edema en la zona. Esto conlleva una actividad sináptica y excitabilidad neuronal que aumenta los niveles de calcio intracelular, produciendo la liberación de neurotransmisores excitatorios (glutamato y aspartato) que dañan las células sanas y favorecen la extensión de la lesión (13,14). También se liberan otros factores inflamatorios como la interleucina 1 (IL1), la interleucina 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y la proteína inhibidora de la mitosis (MIP).

La MIP promueve el edema y aumenta la pérdida progresiva de la mielina en los axones lesionados. De esta manera, se produce la muerte tanto de las neuronas dañadas previamente por la lesión como de las sanas, que indirectamente también se ven implicadas (10).

2º Fase subaguda

Esta fase abarca un proceso de lesión secundaria provocada por la activación glial. La zona de penumbra, más cercana a la zona de la lesión, tendrá una gran actividad glial como consecuencia de los fenómenos de necrosis, isquemia y hemorragia lo que provoca mayor muerte neuronal que la lesión primaria.

Tras el daño neuronal, la microglía y los astrocitos son los encargados de comenzar con la activación glial a los pocos días de la lesión. Se produce una hiperproliferación de estas células junto a cambios como la hipertrofia del núcleo y una sobreexpresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y vimentina. Todo ello forma una malla extensa y densa denominada cicatriz glial (11). Posteriormente, la infiltración de células inflamatorias dará lugar a procesos de fagocitosis de las células dañadas o muertas iniciado con la degeneración Walleriana (5). Las células inflamatorias liberan citoquinas, como el TNFα, que presenta propiedades tanto neurodegenerativas como neuroprotectoras.

La degeneración de la mielina, por otro lado, lleva consigo la liberación de inhibidores que impiden la regeneración axonal mientras se forma la cicatriz glial. Los oligodendrocitos, mientras tanto, expresan proteoglicanos y moléculas que inhiben de la guía axonal (Tabla 1) (10).

3º Fase crónica

Es el estadío más tardío y la fase más estable y predominante. En ella no se producen cambios histológicos ni funcionales. No existe un tiempo determinado en el que se establece pero, en algunos experimentos, aparece alrededor del tercer mes (12).

Esta fase se caracteriza por cambios endógenos que provocan una pérdida gradual en la regeneración neuronal debida a la disminución en la expresión de moléculas promotoras del crecimiento (GAP), en los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos y en la aparición de inhibidores del crecimiento axonal (10).

Tabla 1. Lesión medular: células y mecanismos implicados.

Daño primario (0-24h)	→	Daño secundario (+24h)
Excitotoxicidad	Astrocitos reactivos	Muerte neuronal secundaria
Daño tisular	Degeneración mielina	Desmielinización axonal
Inflamación	Células inflamatorias	Actividad eléctrica deprimida
Muerte celular primaria	Proteoglicanos inhibitorios	Cicatriz glial

El establecimiento de estos mecanismos lesivos provoca un entramado celular y molecular muy característico, la cicatriz glial; proceso desencadenado *sine qua non* a la lesión medular.

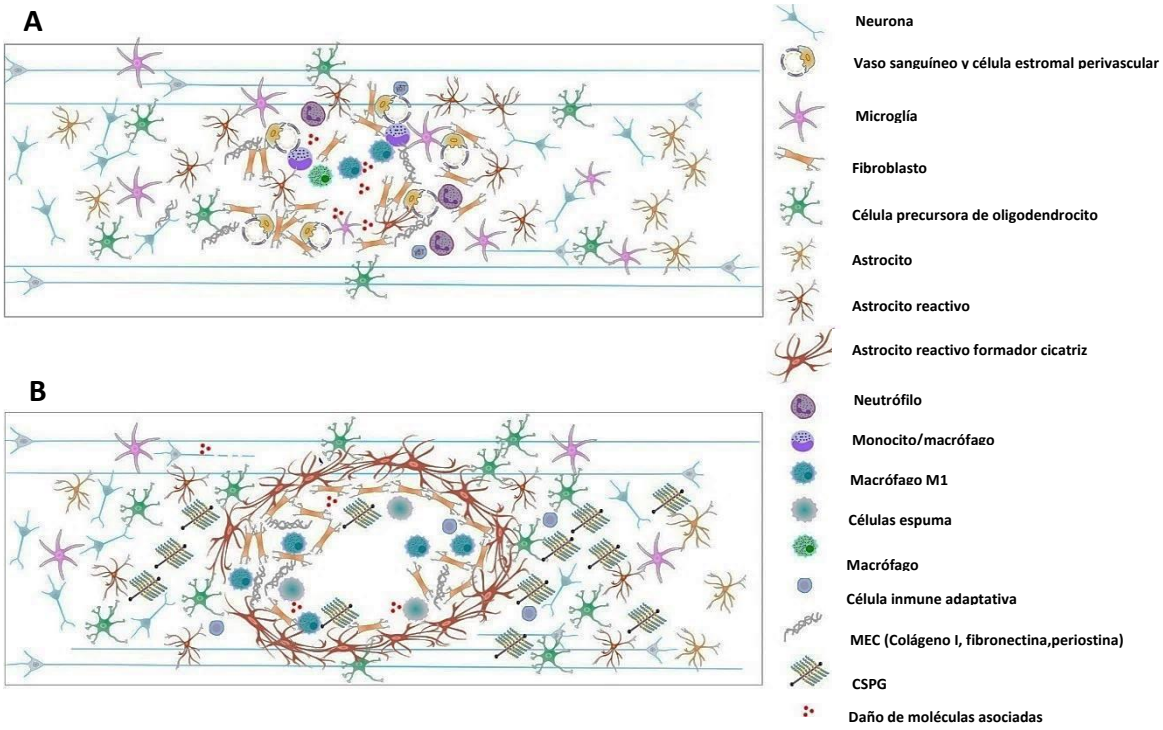
3.4 Cicatriz glial: moléculas inhibitorias implicadas

La cicatriz glial, de la fase subaguda, supone la mayor limitación para la regeneración axonal en las lesiones medulares. Esta malla extensa y gruesa que cubre la lesión se compone de moléculas complejas que inhiben el crecimiento axonal como el proteoglicano condroitín sulfato, semaforinas, efrinas y tenescinas. En cuanto a los tipos celulares presentes en la cicatriz glial, destaca la microglía, los oligodendrocitos, las células meníngeas y los pericitos con efecto inhibitorio para crecimiento axonal (Figura 3) (12).

De este modo, se presupone que al eliminar esta barrera física se puede favorecer el crecimiento axonal. Sin embargo, varios estudios apuntan a un empeoramiento de la lesión si se elimina la cicatriz glial debido a un aumento en la extensión del daño neuronal y por la desmielinización severa que se produce (13).

Consecuentemente al daño secundario, aparece una serie de inhibidores que frenan el crecimiento axonal como los proteoglicanos, las moléculas de guía axonal y los inhibidores asociados a mielina.

Figura 3. Estirpes celulares y moléculas implicadas en la cicatriz glial. A: Cicatriz glial aguda; B: Cicatriz glial crónica. Adaptado de (14).



- Los proteoglicanos (PG) son importantes en las primeras 24h, tras el daño neuronal, hasta varios meses después (10). Los PG se dividen dependiendo de la naturaleza de sus cadenas de glicosaminoglicanos en heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y queratán sulfato (QS). Estos PG son secretados por astrocitos reactivos, oligodendrocitos y células meníngeas. En general tienen un efecto inhibitorio del crecimiento axonal por su efecto repulsivo. De entre todos ellos, el CS es el que más se ha visto implicado en diversos procesos como: migración, diferenciación, proliferación, crecimiento axonal, sinaptogénesis y polaridad neuronal (Figura 3).

- Las moléculas de guía axonal (MGA) son sustancias que pueden estar fijas a un sustrato o difundir y pueden atraer o repeler a los axones. Los conos de crecimiento contienen receptores que reconocen estas moléculas de guía y traducen la información recibida en una respuesta direccional. Las más estudiadas de este grupo son las semaforinas, las netrinas, los Slits y las efrinas (Tabla 2).

- Las semaforinas participan en procesos de migración celular, crecimiento vascular, sinaptogénesis, progresión tumoral y regulación del sistema inmune (10). Cuando son secretadas inhiben el crecimiento del axón en zonas específicas, lo que ayuda a dirigir el crecimiento específicamente en una dirección. Son secretadas por las meninges y fibroblastos de la cicatriz glial y contribuyen al ambiente inhibitorio de la zona lesionada (12).

- Las netrinas (en especial netrina1) actúan como ligando, uniéndose al receptor DDC, en el proceso de atracción axonal y al receptor UNCS, en procesos de inhibición (15). El receptor DDC se encuentra en los axones y en células intestinales diferenciadas. Cuando las netrinas se unen con el receptor DDC,

los axones se orientan hacia la “mejor” neurona diana. El receptor DDC también puede inducir apoptosis en ausencia de netrina 1 (16).

- Los Slits pertenecen a la familia de proteínas extracelulares que participan en el desarrollo neuronal, en la glía axonal y en la migración a través de su unión a una familia de receptores transmembrana denominados *Roundabout* (Robo) (17). Entre esta familia cabe destacar la Slit 2 que se expresa en astrocitos reactivos que rodean al tejido necrótico de la lesión, por lo que pueden formar parte de la zona lesionada (18). La proteína Slit, unida al receptor Robo, produce una repulsión axonal a partir de un gradiente químico (17,19).

  Netrinas y Slits producen efectos opuestos. Estudios recientes han observado que Slit, al activar al receptor Robo, tiene capacidad de unión a DDC, lo que silencia la actividad de netrina 1. De esta forma, el efecto atrayente axonal queda silenciado. En condiciones de existencia de ambos receptores (Robo y DDC) domina el de carácter repulsivo de Robo. Pese a estos resultados, no se descarta que también otros componentes celulares de la cascada de señalización pudieran estar implicados en el silenciamiento de netrina 1 (17).
  Ante estos hallazgos, resulta interesante la posibilidad de bloqueo de receptores repulsivos intrínsecos (Robo) y quizás la no activación de receptores atrayentes (DDC). De este modo, inhibiendo la actividad de repulsión y dejando un mecanismo de atracción para las prolongaciones neuronales se favorecería la regeneración axonal en el SNC.

- Las efrinas regulan una variedad de procesos biológicos durante el desarrollo embrionario, incluida la guía de conos de crecimiento axónico, la migración celular y la segmentación. Las efrinas se dividen en dos subclases: las efrinas A y las efrinas B. En concreto, las efrinas B se sobreexpresan en zonas de lesión y tienen un papel importante en procesos de migración y guía axonal en desarrollo (10).

- Por último, hay una serie de moléculas inhibidoras asociadas a la mielina (MAIS) que se encuentran en la cicatriz glial. Actualmente se conocen Nogo-A, MAG (glucoproteína glial asociada a la mielina) y OMgp (glucoproteína mielina oligodendrocítica) (10). Estas proteínas interactúan con un mismo receptor NgR1 que carece de domino transductor de señales y, por lo tanto, necesitan un correceptor para su función: p75, Lingo 1 y TROY. Gangliósidos, diversas integrinas y el receptor B de inmunoglobulina emparejado (Pir B) también pueden interactuar con los MAIS (Tabla 2) (20).

Tabla 2. Células y factores inhibidores del crecimiento axonal encontrados en lesión secundaria.

Células inhibitorias	Proteoglicanos	Moléculas de guía axonal	Inhibidores secundarios asociados a mielina
Microglía Oligodendrocitos Células meníngeas Pericitos	Heparán sulfato Condroitín sulfato Dermatán sulfato Queratán sulfato	Efrinas Semaforinas Slits Netrinas	Nogo-A, MAG OMgp NgR1, p75, Lingo1, TROY Gangliósidos, Integrinas, Pir B

Por todos estos elementos, que autolimitan la reparación de los axones dañados, la lesión medular supone una pérdida de la integridad fisiológica de las conexiones neuronales. Consecuentemente, la acción que ejercen las motoneuronas encargadas de dar respuesta a la información recibida sobre sus músculos efectores se ve interrumpida. Se podría establecer una similitud con un proceso de retroalimentación negativo donde esta pérdida de integridad, por parte del SNC, supondrá una ausencia de respuestas en los mecanismos y órganos efectores del SNP que, consecuentemente, tampoco podrán enviar señales al SNC.

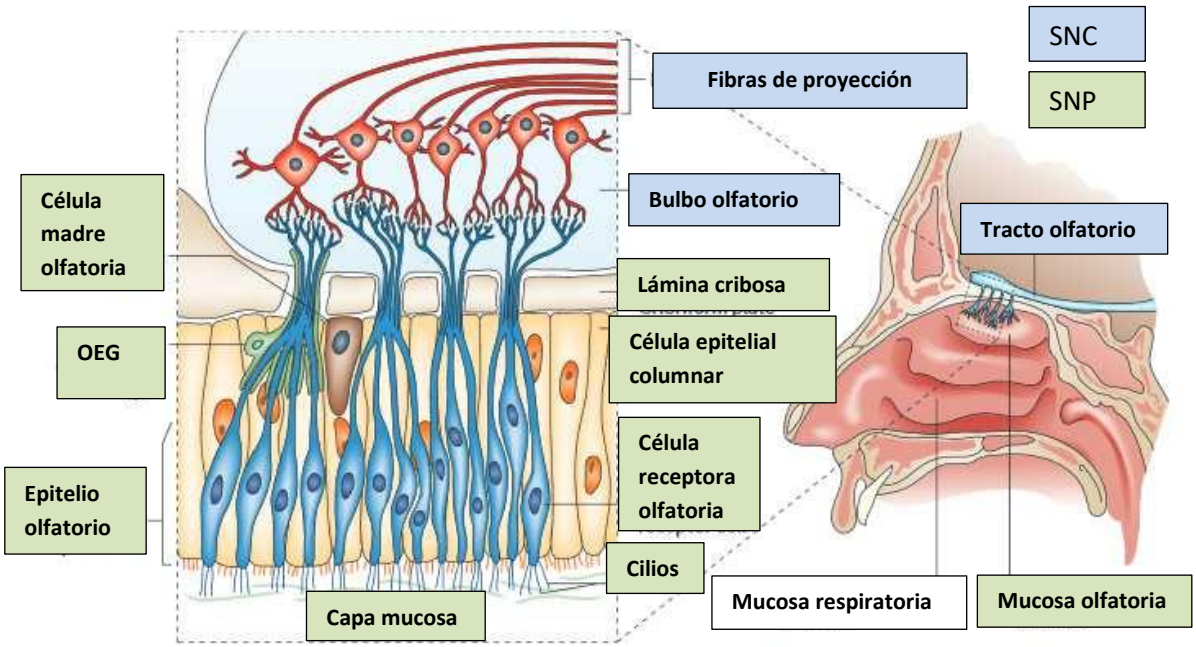
La discapacidad que se produce en el paciente, debido a la lesión irreparable, ha motivado el estudio exhaustivo de los mecanismos lesionales y factores implicados en las lesiones medulares. Una vía de estudio ha sido la búsqueda de estirpes celulares que pudieran promover la reparación y regeneración axonal pudiendo así ofrecer un tratamiento y nuevas esperanzas en el pronóstico de estos pacientes. Entre esas posibles células se encuentra un tipo particular de glía dotada de capacidad reparativa en el sistema olfatorio.

3.5 Glía envolvente olfatoria (OEG)

3.5.1 Origen y localización

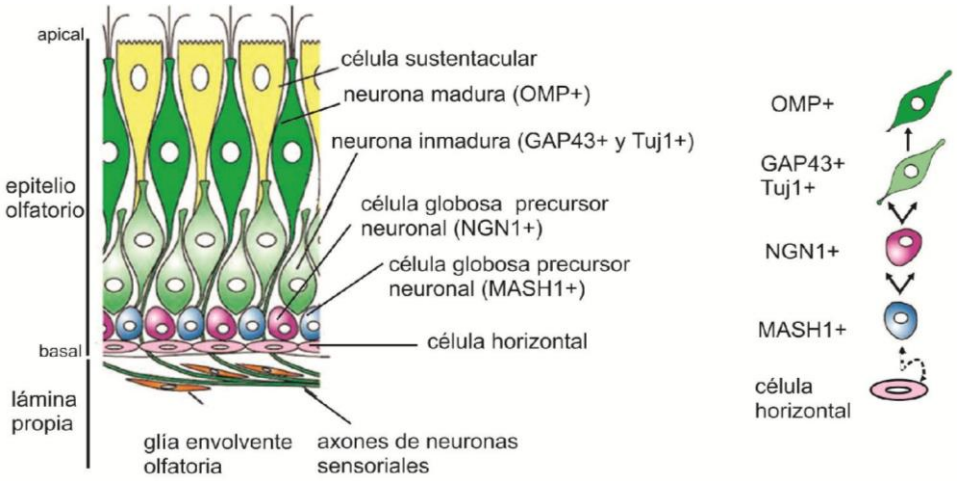
El sistema olfatorio es un conjunto de estructuras del sistema nervioso especializadas en la transducción y el procesamiento de señales químicas, dando origen al sentido del olfato. Las sustancias odoríferas (los estímulos químicos) son detectadas, en el techo de cada cavidad nasal, por la mucosa olfatoria. En esta mucosa se encuentran las células receptoras olfatorias, que son neuronas olfatorias bipolares cuyos axones alcanzan el SNC. El polo basal de estas células da origen a una prolongación axónica amielínica que abandona el epitelio olfatorio por la lámina propia (1). Los conjuntos de axones de las células receptoras olfatorias no se reúnen para formar un solo nervio, sino que se agrupan en fascículos que atraviesan la delgada lámina cribosa del hueso etmoides y las meninges para introducirse en el bulbo olfatorio donde hacen sinapsis con las neuronas principales (21).

Figura 4. Sistema olfatorio. Desde la mucosa olfatoria hasta el bulbo olfatorio los axones de las células olfatorias quedan envueltos por OEG. Adaptado de (10).



La toxicidad que algunas sustancias odoríferas tienen sobre las células receptoras olfatorias hace que se renueven cada 30-60 días. Estas células olfatorias, auténticas neuronas, presentan la capacidad de regenerarse durante toda la vida (22). Las células con capacidad neurogénica la poseen las células horizontales y globosas que se encuentran en la capa basal del epitelio olfatorio. Concretamente, se considera a estas células globosas las responsables del recambio celular de las neuronas sensoriales mientras que las células horizontales permanecen quiescentes durante toda la vida (23). Hacia la superficie del epitelio olfatorio se encuentran estas neuronas con distinto estadio de maduración y con la expresión de distintos marcadores: MASH1, NGN, GAP43; Tuj1, OMP (Figura 5) (24).

Figura 5. **Disposición celular del epitelio olfatorio.** Expresión de marcadores según el estadío de diferenciación de las neuronas sensoriales (24).



La maduración de las neuronas sensoriales conlleva un crecimiento progresivo del axón. Estos axones de las células receptoras olfatorias cuando alcanzan el bulbo olfatorio forman el nervio olfatorio (par craneal I) (25). Acompañando a estos nervios sensoriales durante su trayecto se encuentran astrocitos, microglía y un tipo glial específico, perteneciente a la macroglía, denominada glía envolvente olfatoria (OEG) (21,26).

Aunque en el SNC también se producen neuronas en el hipocampo o en la zona subventricular, no se ha identificado otro sitio en el adulto donde exista un crecimiento a tan larga distancia de las fibras nerviosas con posterior restablecimiento de conexiones (27,28). Esto sugirió que las células de OEG tenían propiedades especiales que permitían el crecimiento axonal de las neuronas sensoriales hacia el bulbo olfatorio.

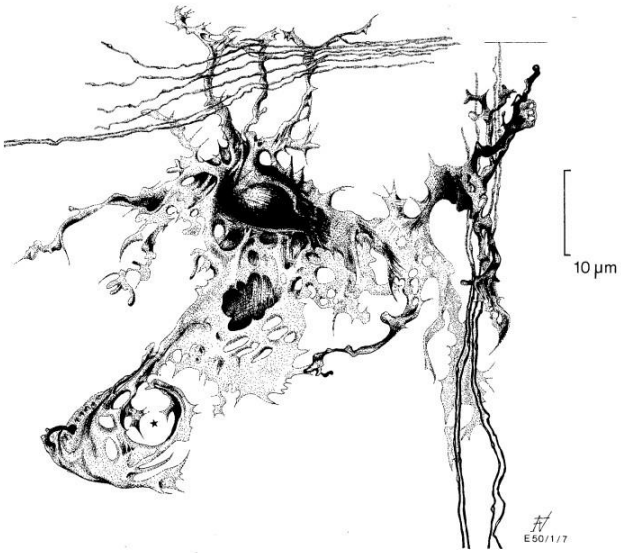
Las células de OEG se originan a partir de células madre del epitelio olfatorio (21,25,29). Las células de OEG poseen la capacidad de unirse a conos de crecimiento axonales, envolverlos y migrar con las fibras en crecimiento a lo largo del SNP y del SNC (21,25,30,31). Las células de OEG son capaces de proporcionar la guía necesaria para dirigir estos axones a sus localizaciones específicas en los glomérulos olfatorios (21).

En el SNC, las células de OEG se localizan en las dos capas más externas del bulbo olfatorio (capa del nervio olfatorio y capa glomerular) mientras que en el SNP recorren todo el trayecto de la vía olfatoria, desde su inicio en la mucosa olfatoria hasta la llegada de sus prolongaciones axonales al bulbo olfatorio (32,33). Inicialmente se pensó que había dos orígenes de las células de OEG: las que provenían de la placoda olfatoria, localizada en la parte rostrolateral de la cabeza embrionaria y las que provenían del bulbo olfatorio, originadas a partir de tubo neural y desarrollado a partir de la terminación rostral de la vesícula cerebral. Posteriormente, a través inmunoensayos, se puso de manifiesto que las células de OEG no son células derivadas del tubo neural, ni de la cresta neural, como el resto de células gliales, sino del ectodérmico derivado de las placodas olfatorias (34).

3.5.2 Características morfológicas y ultraestructurales de las células de OEG

Las células de OEG fueron descritas al microscopio por primera vez por Golgi en 1875 y posteriormente por Blanes en 1889. Se pueden identificar principalmente por la forma característica de sus núcleos indentados y por su localización en el bulbo olfatorio ya que no se ha observado ningún otro tipo de célula glial en la capa del nervio olfatorio (28). Estas células se encuentran en grandes cantidades entremezcladas con fascículos de nervios olfativos (Figura 6)

Figura 6. Dibujo de una célula de OEG, en la capa del nervio del bulbo olfatorio de erizo teñida con el método de Golgi. Adaptado de (28)

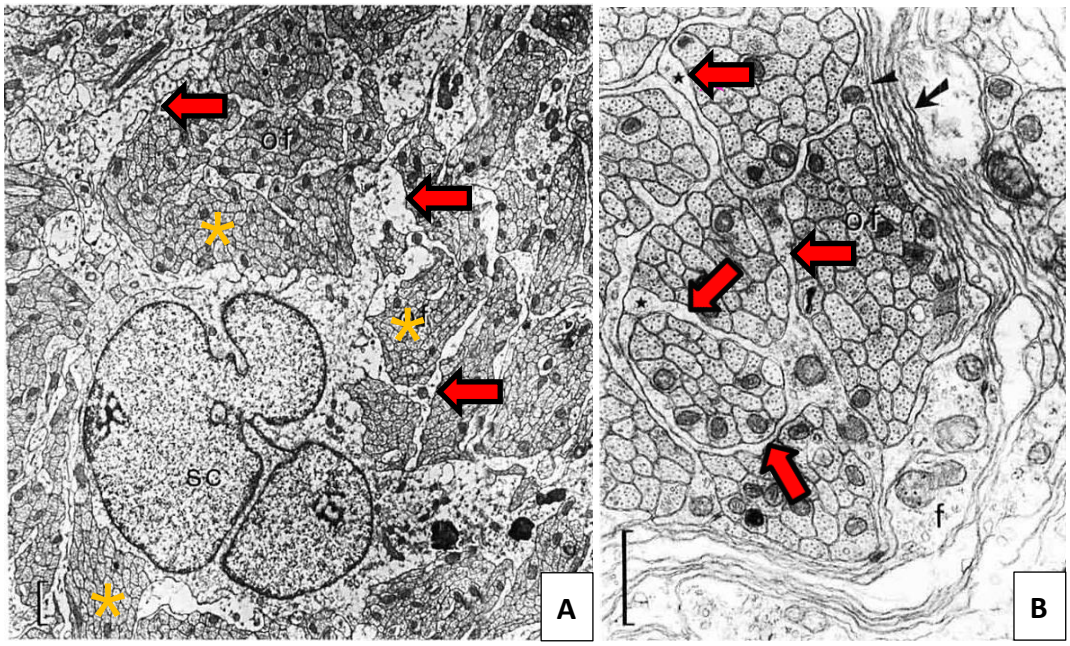


Las células de OEG tienen algunas características de astrocitos y otras de células de Schwann. Al igual que los astrocitos estas células tienen filamentos gliales, forman parte de la glía limitante del bulbo olfatorio y carecen de lámina basal. Entre sus prolongaciones no hay fibras de colágeno y envían pies perivasculares a los vasos sanguíneos (35). Otras características las asemejan a las células de Schwann ya que tienen vimentina, como proteína mayoritaria de sus filamentos intermedios y se encargan de envolver los axones sin mielinizarlos (36).

Las células de OEG forman redes con otras células mediante uniones tipo *gap*. Estos nexos están formados por hexámeros de conexinas permitiendo un intercambio entre las células de OEG y el mantenimiento de la homeostasis celular (37). Se ha visto, a partir de experimentos y registros electrofisiológicos, que la conexina 43 es la proteína predominante en las uniones tipo *gap* de estas células (38).

Las células de OEG presentan una morfología alargada y aplanada con unas prolongaciones citoplasmáticas que les permiten envolver grupos de axones formando una matriz envolvente. Ultraestructuralmente tienen un citoplasma electrodenso, más claro que el de las células de Schwann pero más denso que el de los astrocitos (39). Sus filamentos intermedios se encuentran dispersos por el citoplasma y no están agrupados en haces (30). Las células de OEG tienen un núcleo lobulado típico (Figura 7) que, a veces, presenta indentaciones profundas, con una cromatina homogénea aunque ligeramente condensada junto a la membrana nuclear (26,38,40). Las prolongaciones laminares de estas células son muy delgadas, excepto en los puntos que se ramifican donde se pueden encontrar mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso y haces de filamentos. Las prolongaciones envuelven grupos de axones pero nunca fibras individuales (26).

Figura 7. Micrografía de OEG del bulbo olfatorio de erizo con microscopia electrónica de transmisión. A: Sección trasversal de OEG (SC) con prolongación de su citoplasma (flecha roja) envolviendo a un grupo de axones olfatorios (asteriscos naranja); B: Sección transversal de axones olfatorios cerca de un glomérulo. Las células de OEG (asteriscos) separan y envuelven haces de axones (flechas rojas). Adaptado de (26).



3.5.3 Marcadores de OEG. Similitudes y diferencias con astrocitos y células de Schwann

Las células de OEG tienen unas características fenotípicas y funcionales que las diferencian de una parte de la glía (34). Sin embargo, comparten algunas similitudes inmunohistoquímicas con las células de Schwann y los astrocitos. Por ejemplo, las células de OEG producen neutrofinas y receptores para factores de crecimiento similares a las células de Schwann, lo que hace que puedan ser cultivadas, al igual que estas, a partir de tejido adulto y purificadas a gran escala (21,34).

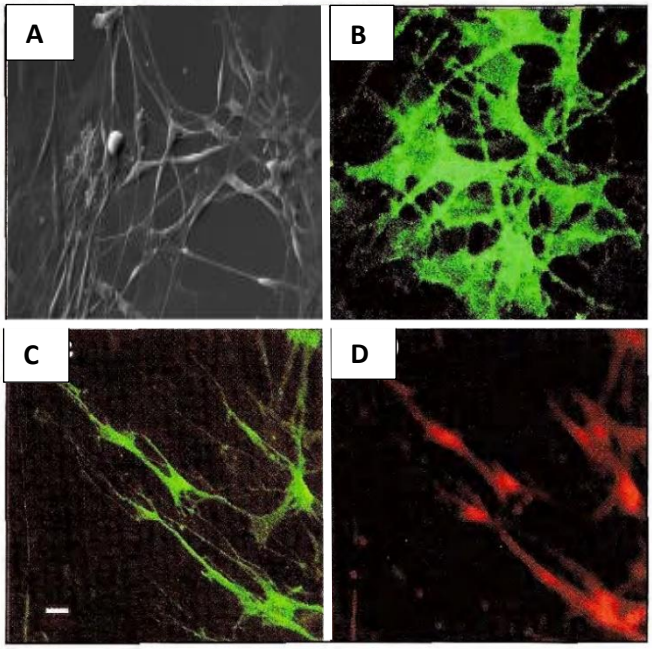
También comparten marcadores con los astrocitos. Ambas estirpes celulares expresan GFAP y pertenecen a la glía envolvente del SNC, la denominada *glia limitans,* que forma una delgada barrera de separación entre las prolongaciones terminales de los astrocitos y la piamadre que rodea el encéfalo y la médula espinal (28,41). De hecho, la glía envolvente puede realizar acciones de ambas estirpes celulares (astrocitos y células de Schwann) cuando se trasplanta en lesiones medulares (34). A pesar de estas similitudes, la glía envolvente presenta unas propiedades inmunocitoquímicas únicas que la diferencia de los grupos gliales descritos (19).

Inicialmente, se pensó en la existencia de diferentes estirpes de OEG en la vía olfatoria a causa de la variabilidad en la intensidad de tinción inmunohistoquímica para GFAP (28). Por lo general, se acepta que todas las células de OEG expresan S100B, proteína intracelular ligante de calcio y GFAP (Figura 8) (42). No obstante, las células de OEG tienen distintos marcadores según su localización.

En la parte externa de la capa del nervio olfatorio se marcan débilmente para el receptor de neutrofina p75 (p75NTR), relacionado directamente con el factor de crecimiento neutrófico (NGF) (Figura 8) y la molécula embrionaria de adhesión neural (E-NCAM). Sin embargo, en la parte interna de la capa del nervio olfatorio, son positivas para neuropéptido Y pero no expresan p75NTR ni E-NCAM (21,34).

Esta variabilidad en la expresión antigénica podría deberse al estudio con diferentes especies, a distintas etapas de desarrollo o a dificultades en el marcaje inmunohistoquímico que pudieran ser causa de un artefacto (21,34). La variabilidad de las células de OEG en su expresión antigénica hace que no se pueda usar un único marcador (43).

Figura 8. Microscopia óptica de OEG, en cultivo primario, extraídas de bulbo olfatorio de rata adulta (A-D). A: Con contraste de fases se observa la morfología bipolar y gran cantidad de prolongaciones. B: Inmunorreactividad para p75 NGF; (C-D): Colocalización para p75 NGF (C) y para S100 (D). Modificado de (44).



Además de la diferencia en la expresión antigénica de las células de OEG, también se planteó la existencia de dos patrones morfológicos en cultivos celulares. Las células de OEG identificadas en cultivo podían presentar morfología similar a células de Schwann o astrocitos (34).

Por tanto, las células de OEG en cultivo tienen similitudes a las células de Schwann cuando tienen forma de huso (bipolaridad) y son positivas para p75NTR, S100B y GFAP (generalmente de expresión débil). Por otro lado, son parecidas a los astrocitos cuando las células son aplanadas, tienen forma multipolar y son negativas para p75NTR, muy marcadas para GFAP y expresan S100B (Tabla 3) (21,34,35). Sin embargo, se ha visto que pocas de las células con morfología estrellada, similares a los astrocitos, son positivas para GFAP (21,28). En estudios donde se cultivaban OEG que no procedían del SNC, la GFAP iba desapareciendo. Esto hizo suponer que esta estirpe de OEG podrían ser realmente astrocitos procedentes glía del bulbo olfatorio

(45). También se han encontrado diferencias en la expresión de E-NCAM en estas dos posibles subpoblaciones de OEG. Las células similares a las de Schwann son negativas para E-NCAM, mientras que las células de OEG, similares a astrocitos, son positivas para E-NCAM (34).

Finalmente, ante estos resultados, se estableció la posibilidad de que no fueran diferentes estirpes celulares de OEG si no distintos fenotipos que pudieran variar su morfología y parecerse a astrocitos o a células de Schwann. Esta hipótesis no se ha podido comprobar ya que únicamente se han utilizado técnicas inmunohistoquímicas y podría haber contaminación en los cultivos de OEG con astrocitos y células de Schwann y, por tanto, que realmente no fueran subpoblaciones de las células de OEG (34,46).

Tabla 3. **Comparación de algunas características entre las células de OEG, los astrocitos y las células de Schwann**.

PROPIEDADES	OEG	Astrocitos	Células de Schwann
Origen embrionario	Placoda olfatoria	Vesícula cerebral	Cresta neural
Contacto axonal	Si	No	Si
Formación *glia limitans*	Si	Si	No
Formación lamina basal	No (excepto en *glia limitans*)	No (excepto en *glia limitans)*	Si
Migración en SNC	Si	Si	No
Receptor NGF	Si	No	Si
GFAP	Si	Si	Si
S100B	Si	Si	Si
E-NCAM	Si	No	Si
Proteína básica de mielina	Si	No	Si

Los resultados obtenidos en estudios moleculares también permitieron conocer que las células de OEG expresan una serie de proteínas que pueden estar implicadas en el proceso de crecimiento y regeneración axonal. Entre esas proteínas se encontrarían las moléculas de adhesión promotoras de crecimiento axonal, la molécula de adhesión neuroglial L1 (Ng CAM-L1), la fibronectina y la nexina derivada glial (21,34). Estas células también expresan neutrofinas como: el factor de crecimiento de nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y otras como las NT-3 y NT-4 (Tabla 4).

Finalmente, también se estableció la existencia de otros factores promotores encontrados en la matriz extracelular (MEC) como la laminina (sustrato preferencial de las células de OEG para la extensión de neuritas de los nervios olfatorios *in vitro* (47),

la fibronectina, el colágeno tipo IV (Tabla 4) y otros sustratos favorecedores de crecimiento que pudieran tener repercusión quimiotrópica para los axones (34,35).

Tabla 4. Principales proteínas expresadas por OEG y factores promotores que pudieran estar implicados en la regeneración y extensión axonal.

PROTEÍNAS	FACTORES PROMOTORES (MEC)
Ng CAM-L1, FIBRONECTINA NEXINA DERIVADA GLIAL NEUTROFINAS: NGF, BDNF, GDNF, NT-3, NT-4	LAMININA FIBRONECTINA COLAGENO IV

Los estudios morfológicos e inmunocitoquímicos de las células de OEG justificaban su actividad en la promoción y reparación axonal, pero se vio la necesidad de determinar la mejor localización para su extracción y/o cultivo con la idea de su posterior utilización en trasplantes.

3.5.4 Obtención y fuente de OEG

Las células de OEG se pueden obtener de individuos adultos, tanto del epitelio nasal (OECGs-OE) como de las capas superficiales del bulbo olfativo (OEG-OB) (30,33).

Las células de OEG-OB resultan interesantes porque pueden evitar el riesgo de infecciones a la hora de su trasplante. En el epitelio nasal, la presencia de células de Schwann y otras estirpes celulares, difíciles de eliminar, pueden dificultar la integración de las células de OEG en el SNC. El trasplante mixto de OEG y células de Schwann podría añadir otra variable a la hora de interpretar los resultados obtenidos (35). Por otro lado, las células de Schwann provocan mayor reactividad en los astrocitos que las células de OEG y una mayor expresión de moléculas inhibitorias. Esto supondría que, el trasplante de OEG-OE, aumentaría la dificultad de migración de las fibras en el SNC. Por este motivo, parece óptima la extracción de OEG-OB en comparativa a las células de OEG-OE en experimentos de regeneración de lesiones medulares (35).

En cuanto a la fuente, se utilizan las células de OEG-OB de roedores debido a que en estos mamíferos el tamaño relativo es del 2% del volumen del cerebro frente al 0.01% de primates. Sin embargo, la anatomía y funcionalidad del sistema nervioso de los primates es muy diferente, por lo que la capacidad de regeneración axonal de las células de OEG podría variar entre especies (35). Por ese motivo, se han utilizado en humanos el trasplante de OEG a partir de células criopreservadas de fetos o de otras especies de mamíferos más afines como de cerdos (34). También se ha propuesto que las células de OEG podrían ser obtenidas del propio paciente (autotrasplante). De esta forma se evitaría el posible rechazo del tejido, el uso de inmunosupresores y tener que buscar un donante idóneo para el receptor. Otro punto a favor del autotransplante es que mejoraría la accesibilidad para su obtención y evitaría los problemas éticos ocasionados por trasplantes de células madre, fetales o embrionarias.

Por tanto, la obtención de una estirpe celular de OEG estable, previa a su trasplante, es de gran interés en este campo. Las líneas celulares inmortalizadas de OEG que mantienen las propiedades regenerativas de los cultivos primarios proporcionan una fuente ilimitada de estas células para estudios básicos y aplicados. De hecho, una línea clonal inmortal de OEG de rata, la TEG3, ha demostrado ser tan buena como la OEG de cultivos primarios para promover la regeneración de axones en cultivo y en trasplante (48).

El papel de guía de la OEG en los nervios sensoriales a los que acompañan, los marcadores que expresan con características de promoción regenerativa y su localización accesible para su extracción ha despertado gran interés para ser utilizadas en el tratamiento de lesiones medulares. Pero previo al trasplante en humanos, es necesario conocer los resultados obtenidos con animales de laboratorio y las variables que pueden influir en la actividad de estas células.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

En la realización de este trabajo de fin de grado, se siguió un diseño de carácter descriptivo basado en la búsqueda y revisiones bibliográficas con el fin de poder contrastar e integrar la información encontrada y, finalmente, hacer una síntesis sumatoria.

Estrategias de búsqueda

Las bases de datos empleadas en la búsqueda bibliográfica fueron Pub Med, ScienceDirect, ClinicalKey, Google Académico y Alcorze.

Los criterios de inclusión de artículos fueron los siguientes: publicados desde 1984 a 2020, a texto completo, en español e inglés, con título relacionado con el tema expuesto y considerándose válidos aquellos que cumpliesen con los objetivos planteados y fuesen de interés para la elaboración del trabajo.

Con respecto al tipo de documentos seleccionados, se eligieron guías de práctica clínica, tesis, revisiones, artículos divulgativos, estudios de investigación originales y revistas de publicación científica.

5. DESARROLLO

5.1 Procedimiento previo y trasplante de OEG

La obtención de OEG, a partir de animales como roedores, facilita la extracción de estas células, gracias a su gran accesibilidad para su posterior trasplante. Sin embargo, la localización de las células en lugares de menor asepsia y la dificultad de obtener un cultivo puro supone una dificultad y la necesidad de seguir unos pasos previos. Por tanto, las células de OEG deben ser extraídas, cultivadas y purificadas mediante una serie de procesos para dotarlas de estabilidad y capacidad de reparación.

Los cultivos primarios de OEG se obtienen a partir de la disección del bulbo olfatorio y nervios olfatorios de ratas y monos mayoritariamente. Se empieza cortando la piamadre de manera muy rigurosa para evitar la aparición de posibles células contaminantes como los fibroblastos. Posteriormente se lava el tejido, que contiene las células de OEG, se sumerge en tripsina y antibióticos y se procede a la siembra en placas con poli-L-lisina. Seguidamente se realizan lavados y recultivos de manera reiterada; manteniéndolas en la incubadora hasta su utilización. El trasplante de células de OEG purificadas debe realizarse antes de cumplir 2 semanas de cultivo *in vitro* (35).

La cirugía para producir la lesión se efectúa a partir de unos parámetros establecidos de anestesia, tratamiento antibiótico e hidratación. Para esto se realiza una laminectomía, que expone los segmentos medulares y estabiliza la columna vertebral a partir de puentes de resina. Pasado unos meses de la cirugía (de 1 a 4 meses después de la lesión) se procede a la apertura cuidadosa para localizar la zona del muñón y se inyectan las células de OEG (de 200.000 a 500.000 células/muñón) en varios puntos con agujas de vidrio (35).

En otras operaciones con ratas, se someten a lesiones inducidas a través de radiofrecuencia. Esta operación tiene la ventaja de que prácticamente no hay sangrado ni daño en huesos o ligamentos, puede repararse mediante sutura cutánea y causa menos molestias a los animales (49).

En otros experimentos, para evitar los problemas asociados con los cultivos primarios, se utiliza una línea celular de OEG que solo necesita cultivarse una vez para mantenerse *in vitro* indefinidamente después de la transformación con el antígeno T grande SV40. Además, esta línea celular no requiere el aislamiento tedioso con muchos animales o mitógenos para mejorar el crecimiento en cultivo. Sin embargo, la inmortalidad de estas células puede conducir a una alteración en su capacidad de regeneración axonal (48,50).

Si el trasplante es a partir de OEG procedente del epitelio olfatorio, se tiene la complicación añadida de contener otras estirpes celulares como las células de Schwann. En este caso, es necesaria la determinación de GFAP y p75 para diferenciar cuáles son las células de OEG y proceder solo al cultivo y al trasplante de estas (51).

Otro abordaje diferente consiste en el xenotrasplante de OEG de cerdos transgénicos, para evitar posibles rechazos, a primates con lesiones medulares. En este caso se

induce una lesión desmielinizante por la inyección directa de bromuro de etidio o lisofosfatidilcolina en la columna dorsal a través de una micropipeta de vidrio (54).

Una vez comprobada la viabilidad y actividad de las células de OEG e inyectadas en las lesiones, se espera de 2 a 5 semanas para comprobar la efectividad del trasplante.

5.2 Resultados del trasplante de OEG para el tratamiento de lesiones medulares

Para determinar si los resultados obtenidos al trasplantar las células de OEG han sido exitosos, es necesario que haya un grado mínimo de recuperación en los axones lesionados; pudiendo existir diferentes grados de recuperación.

Para comprobar los resultados de crecimiento axonal y la reparación tras el trasplante, se utilizan trazadores neuroanatómicos. Uno de los más utilizados es el compuesto por una lectina de trigo (WGA) conjugada con peroxidasa, que es captada por la membrana neuronal de los axones. Primero la captación se produce en los axones distales a la lesión y se transporta de forma retrógrada a los somas neuronales. De esta manera, las neuronas y axones que han sido regenerados y recuperados quedan marcados. La inyección de este trazador se realiza en distintos puntos del muñón caudal de la médula espinal; utilizando el mismo tipo de aguja que en la cirugía para producir la lesión (35). Sin embargo, no siempre se utilizan estas evidencias anatómicas y se considera efectivo el trasplante si se observa una mejoría en test conductuales.

De esta forma, se han obtenidos distintos resultados ante el trasplante de OEG según los diferentes factores implicados: modelo de lesión, modelo animal o tipo de OEG trasplantada. Con esta variabilidad encontramos en la bibliografía tanto trasplantes efectivos (con distinto grado de recuperación) como ineficaces (Tabla 5).

Hay varios ejemplos de trasplantes de OEG efectivos. En trabajos con lesiones de médula espinal del tracto corticoespinal, fimbria-fórnix y áreas de desmielinización del SNC de ratas, se ha mostrado que pueden promover la regeneración axonal, la reparación del SNC y la promoción de procesos de remielinización (34,52). En otra publicación, con trasplante OEG en modelos de ratas parapléjicas debido a la médula espinal transeccionada, se ha demostrado regeneración axonal y recuperación de la funcionalidad sensorial y motora, en test conductuales, en comparación con el grupo control. Además de las células de OEG trasplantadas, estas ratas también se sometieron a ejercicio físico durante el estudio. Este ejercicio podría repercutir en los resultados finales obtenidos al ser un estímulo complementario junto a las células de OEG trasplantadas (35).

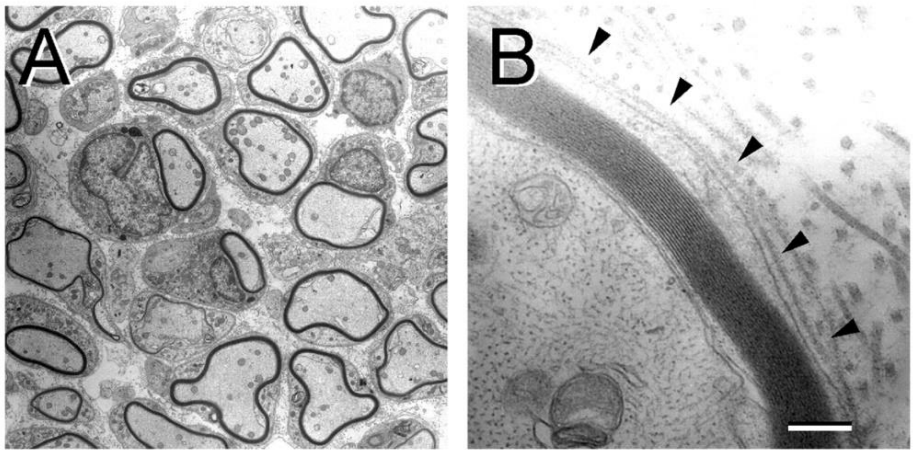
En otros estudios, pero con modelos de contusión de la médula espinal en ratas adultas, pasado un mes, un 64% de sus fibras estaban desmielinizadas, algunos axones estaban intactos pero no eran funcionales o progresaban a una degeneración Walleriana distal al sitio de la lesión (5,34). Pese a la teoría de que las células de OEG no producen mielina, hay resultados que indican la posibilidad de mielinización en la zona de la lesión o en modelos desmielinizantes, aunque no son concluyentes (50,52,53).

Otros autores han empleado tiempos de supervivencia más largos (7 meses) y trasplante de OEG-OB de rata adulta en sección completa de la médula espinal torácica. En este caso, se ha visto una recuperación de la movilidad en las patas traseras y respuesta a estímulos de la piel con reflejo sensitivo (34). En un estudio similar de trasplante de OEG en ratas, también se vio una mejora en la locomoción y en las patas para escalar tras una hemisección de médula espinal (34,54).

A partir de un modelo de lesión por contusión en la médula espinal y trasplante en ratas adultas, se observó que las células de OEG eran menos eficientes que las células de Schwann en la promoción de crecimiento axonal y recuperación de la locomoción en las patas posteriores. Se ha especulado con que las células de OEG podrían participar en procesos de migración y extensión de las células de Schwann endógenas hacia la zona de reparación del SNC (55,56). Pero, la dificultad en la diferenciación entre las células de OEG y las células de Schwann *in vivo*, plantea la posibilidad de que la remielinización fuese debida a células de Schwann de origen endógeno exclusivamente y no de la OEG trasplantada en la lesión (21,34).

Para abrir la posibilidad de trasplantes de OEG en humanos, se han realizado algunos experimentos en otras especies más afines. El trasplante en primates, con OEG procedentes de cerdos transgénicos, ha obtenido resultados prometedores. Cuatro semanas después del trasplante de las células de OEG, se encontró remielinización en 62,5% de la lesión, mientras que prácticamente no hubo en los controles no trasplantados (Figura 9). Esto, junto con la demostración inmunohistoquímica de las células trasplantadas dentro del área lesionada, confirmaron que las células de OEG habían permitido la remielinización (57).

Figura 9: Micrografía de axones remielinizados con microscopia electrónica de transmisión. A: Campo de la zona de trasplante con varias células rodeando axones remielinizados; B: Imagen a mayor aumento de un axón remielinizado rodeado por la lámina basal de esta célula (puntas de flecha). Adaptado de (57).



Como se ha indicado, la mayor parte de estudios utilizando estas técnicas se han realizado a partir de roedores y primates. Hay pocos ensayos en humanos que por motivos éticos no se recomiendan. Además, la información científica y clínica sobre los procedimientos experimentales empleados es muy poca.

En un estudio con pacientes parapléjicos a nivel torácico y lesiones estables (T4-T10) se les hizo un seguimiento durante 3 años tras el trasplante de OEG. Los criterios de inclusión en el estudio fueron muy rigurosos y se excluyeron quienes presentaban siringomielia previa (quiste en cavidad medular). Los pacientes debían estar "psicológicamente preparados". De esta forma, si había algún cambio negativo que pudiera atribuirse al trasplante, especialmente en el grupo de control, tendrían el apoyo del entorno social y familiar. Durante el cultivo de OEG del epitelio olfatorio, no se pudo demostrar la presencia de células de Schwann. La inyección fue a través de un micromanipulador para evitar la contaminación durante el trasplante y la cirugía. Los resultados fueron parcialmente satisfactorios al no haber complicaciones secundarias al trasplante (ni infecciones ni siringomielia postrasplante) pero, contrariadamente a lo esperado, no hubo resultados de recuperación axonal (58).

Otro estudio, se realizó con 7 pacientes tetrapléjicos y mediante trasplante de tejido fetal con OEG en China. Se realizaron controles pre- y posoperatorios con resonancia magnética hasta un año después del trasplante. No se obtuvieron resultados concluyentes pero se observaron complicaciones secundarias como meningitis e hipotonicidad posoperatoria. En el trabajo se pide que, en ausencia de un protocolo válido de ensayos clínicos, los médicos no deberían recomendar este procedimiento a los pacientes (59).

Tabla 5. Modelos de lesión, tipos OEG trasplantadas y resultados obtenidos (34).

Modelo de lesión	Modelo animal	Tipo de OEG trasplantada	Resultado
Lesión del tracto corticoespinal	Rata adulta	OEG de bulbo olfatorio de ratas	Regeneración, recuperación funcional
Desmielinización de la médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio de ratas	Remielinización
Desmielinización de la médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio humanas	Remielinización
Desmielinización de la médula espinal	Primate	OEG de cerdo transgénico H-transferasa	Remielinización
Desmielinización de la médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio humanas	Remielinización
Sección de la médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio de ratas	Regeneración, recuperación funcional
Sección de la médula espinal, trasplante tardío	Rata	OEG de tejido nasal de rata	Regeneración, recuperación funcional
Sección de la médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio de cerdo	Conducción axonal
Sección médula espinal	Rata	OEG modificadas por ingeniería genética productoras de GDNF	Regeneración axonal, recuperación funcional
Sección de medula espinal	Rata	OEG criopreservadas	Regeneración, recuperación funcional
Hemisección médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio de rata	Regeneración, recuperación funcional
Hemisección de la médula espinal, trasplante tardío	Rata	OEG de bulbo olfatorio de rata	Regeneración, recuperación funcional
Hemisección de la médula espinal, OEG nasales	Rata	OEG de bulbo olfatorio de ratas	Reducción de la cicatriz y cavidad

Hemisección dorsal de la médula espinal, OEG modificadas productoras de BDNF	Rata	OEG de bulbo olfatorio transfectadas con el gen de neutrofinas	Regeneración, recuperación funcional
Lesión médula espinal, OEG de línea celular	Rata	OEG de bulbo olfatorio de rata	Regeneración, recuperación funcional
Sección de la médula	Humanos	OEG de biopsia nasal	No complicaciones, no recuperación funcional
Sección de la médula	Humanos	OEG de bulbo olfatorio de fetos humanos	No recuperación funcional, complicaciones
Contusión de la médula	Rata	OEG de bulbo olfatorio de rata	No regeneración a las 6 semanas
Contusión de la médula espinal	Rata	OEG de bulbo olfatorio de rata	Regeneración axonal

Aunque los trasplantes de OEG en rata han obtenido resultados satisfactorios, los últimos estudios siguen estableciendo limitaciones en cuanto a su eficacia. Por un lado, no hay reparación de las fibras en trasplantes a humanos (58,59) y se desconoce si son las células de OEG las encargadas de la regeneración cuando se trasplantan a ratas o a primates (35,48–50). Por esto, se han propuesto estrategias que pudieran potenciar y mejorar el trasplante de OEG ante lesiones medulares.

5.3 Estrategias de mejora complementaria a las células de OEG

Las células de OEG presentan algunos inconvenientes. El principal, como células pertenecientes al sistema glial, es que tienen la capacidad de transformación oncogénica y producir gliomas. También se añaden otros problemas como la necesidad de posteriores cultivos tras su extracción y la limitación en alcanzar los axones lesionados para su posterior reparación. Por todo ello, se hacen necesarias estrategias que mejoren la seguridad y la funcionalidad de estas células sin excluir la necesidad de un tratamiento multidisciplinar, lo más precoz posible por las consecuencias y repercusiones infralesionales que se producen.

5.3.1 Cultivo estable de OEG. Las células TEG3

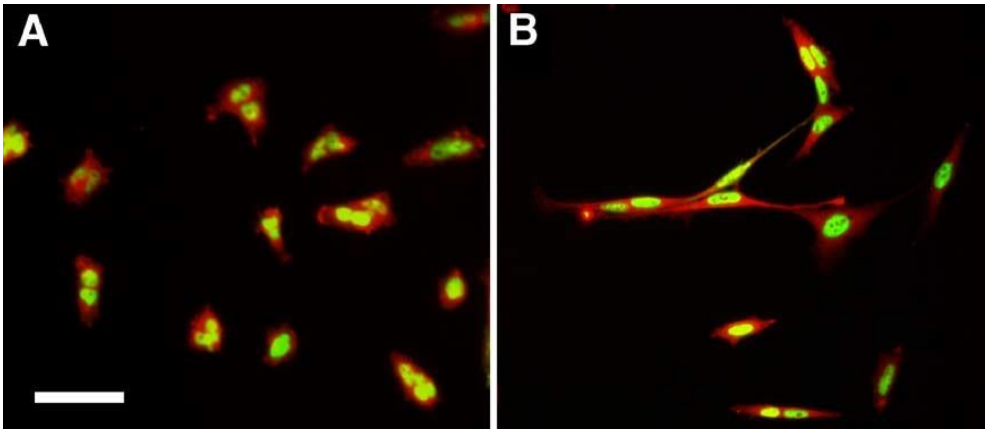
Las células de OEG, una vez que se extraen, necesitan varios pasos para llegar a tener la capacidad reparadora y ser trasplantadas en el SNC. Los cultivos primarios de OEG, extraídos directamente de bulbo olfatorio, no resultan exitosos *in vitro* para la regeneración de fibras nerviosas (10). Por ello, se investigaron estirpes celulares estables e inmortales de OEG que mantuvieran las propiedades de los cultivos primarios y proporcionaran una fuente ilimitada para estudios básicos y aplicados. De hecho, una línea clonal específica de OEG de rata, las TEG3, demostró ser tan buena como las células de OEG de cultivos primarios para promover la neuritogénesis y la regeneración de axones. Como ya se ha indicado, las células TEG3 tienen capacidad regenerativa sin tener que estar en constantes extracciones y posteriores subcultivos (60).

La transformación de las células de OEG en células TEG3 se realiza usando el antígeno T grande SV40 expresado a partir de un promotor celular constitutivo. De esa forma se hacen inmortales las células de OEG y se pueden distinguir, del resto de

tipos celulares una vez integradas en el trasplante, con anticuerpos anti-T-SV40 (Figura 9). Dependiendo del medio de cultivo, las TEG3 presentan distinta morfología aunque la mayoría adquieren la forma bipolar típica de las células de OEG (Figura 9B) pero manteniendo la funcionalidad y marcadores que las caracterizan (48).

Las células TEG3, por tanto, pueden adquirir una morfología de tipo astrocito o de células de Schwann dependiendo de las condiciones del cultivo (Figura 9). En la médula espinal lesionada eran capaces de sobrevivir durante 10 semanas tras su trasplante y se integran en la médula espinal, adoptando morfologías de células de Schwann, astrocitos o formas intermedias permitiendo el crecimiento axonal del tracto corticoespinal. Los animales trasplantados con células TEG3 también recuperaban la función sensorial y motora después de la lesión (48).

Figura 9. Células TEG3 inmunopositivas al antígeno T grande SV40 (verde) y al marcador citoplasmático 3-fosfoglicerato (rojo). A: Con medio de cultivo M10 tienen aspecto de astrocitos; B: Con medio de cultivo ME3, la morfología es parecida a las células de Schwann. Modificado de (48).



Como se había usado el oncogén T-SV40 para inmortalizar las células OEG, era importante analizar su potencial oncogénico *in vivo*. Después de casi dos semanas, no se observaron tumores de la médula espinal en ninguno de los animales trasplantados con células TEG3 (49).

Por último, las células TEG3 han sido utilizadas como estirpe estable de las células de OEG, para estudios *in vitro* de quimioatracción, que permitan establecer una ruta migratoria más eficaz hacia el lugar de la lesión (10).

Con esta estrategia, las células TEG3 pueden regenerar y reparar las lesiones sin su trasformación a células oncogénicas y sin la complicación de los cultivos primarios.

5.3.2 OEG y telomerasa

La estabilidad de las células de OEG también se ha conseguido a partir de mecanismos enzimáticos ya existentes en la actividad celular como la telomerasa.

La vida media de una célula y por tanto, la actividad que desempeña, viene determinada por el acortamiento en los extremos de sus cromosomas, los telómeros. Conforme disminuye el tamaño de estos, la célula va envejeciendo hasta producirse su

apoptosis. Esto ocurre en los cultivos primarios de OEG cuando se dividen repetidamente.

La telomerasa, es una enzima que permite el alargamiento de estos telómeros. Sin embargo, en las células somáticas maduras, la función de la telomerasa queda reprimida tras el nacimiento, provocando un acortamiento de los telómeros en cada división celular, proceso conocido como envejecimiento o senescencia. Es por ello que la activación de la telomerasa en las células de OEG podía aumentar la vida media de estas células, evitar su transformación tumoral y conferirles estabilidad. Esto supondría una mayor biodisponibilidad celular y un aumento para posibles trasplantes posteriores en lesiones del SNC en humanos (61).

Se sabía que la OB-OEG de primates tenía una vida útil relativamente larga, en las mismas condiciones de cultivo que la de roedores que se dividían solo tres o cuatro veces. Además eran más sensibles al estrés oxidativo y se volvían senescentes después de la tercera semana *in vitro*. Se comprobó que la telomerasa producía la senescencia temprana de la OB-OEG de roedores y una protección contra el estrés oxidativo (62).

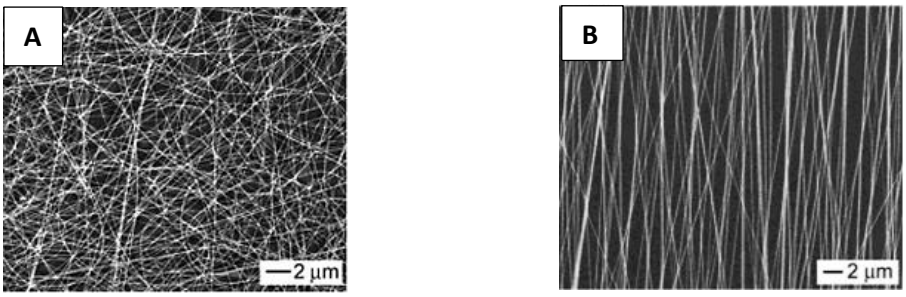
Por tanto, las células de OEG podrían mejorar su supervivencia y resistencia si se modificara la actividad de la telomerasa. Con los primeros resultados, se propuso su aplicación para el tratamiento de patologías degenerativas, isquémicas y traumáticas del sistema nervioso. Sin embargo, estas células fueron patentadas (61) lo que podría haber limitado su uso en otros experimentos.

5.3.3. Nanofibras de PLA para facilitar la migración de OEG

Otra posible estrategia para potenciar la actividad de la OEG se basa en crear un sistema de guía para estas células. Es aquí donde intervienen las nanofibras, concretamente las de ácido poliláctico (PLA).

La elección del sistema de nanofibras se basa en su propiedad como biomaterial y su fácil obtención mediante *electrospinning*. Estas nanofibras presentan un diámetro que se puede variar, lo que permite adaptar el tamaño según las necesidades específicas que se requieran (Figura 10). La forma de variar el tamaño viene determinado por: la concentración de polímero en la solución, su viscosidad, el solvente utilizado, la conductividad de la solución y el flujo de salida.

Figura 10. Micrografía de nanofibras de PLA generadas por *electrospinning* con microscopia electrónica de barrido. Según el tipo de colector las nanofibras se presentarán de manera entrecruzada (A) o se dispondrán de manera ordenada (B). Modificado de (10)



En cuanto a la elección del tipo de nanofibras, hay una gran variedad, pero el uso de PLA está directamente relacionado con sus propiedades en biomedicina e ingeniería de tejidos. El PLA es biodegradable y tiene gran porosidad y flexibilidad, siendo ideal como soporte para células. Estas fibras también tienen una buena capacidad de modificar el componente químico de su superficie y adaptarse al tipo celular que tenga presente. También poseen la capacidad de simular un entorno de matriz extracelular si se orientan sus fibras de manera aleatoria. Esto puede permitir su uso en la reparación o sustitución de tejidos lesionados (10).

A través de un modelo preliminar, *in vitro*, de lesión medular, se ha estudiado la aplicación de nanofibras de PLA como quimioatrayentes de factores moleculares. Esto puede permitir, a las células de OEG, atravesar el entorno inhibitorio de la cicatriz glial y facilitar que alcancen los axones para posibilitar su regeneración. Esta ruta migratoria, con nanofibras de PLA puede funcionar junto a la quimioquina factor-1 α derivado de células estromales (SDF1α). Las células de OEG prefieren sustratos permisivos con laminina (presente en lesiones medulares) o SDF1α a sustratos inhibitorios con el CSPG, encontrado en el entorno propio de cicatriz glial tras una lesión medular (10,47).

En un estudio con la línea celular TEG3 inmersa en un sustrato inhibitorio (CSPG) y en sustrato permisivo (laminina y SDF1α) se vio que, a las 24 horas, las células se adherían en un 11% a CSPG mientras que el 89% restante se adherían al sustrato permisivo. En el caso de los sustratos con laminina o con SDF1α, no había preferencia de las células por ninguna de ellas en concreto (10).

Tras el reconocimiento de la funcionalidad de las nanofibras y que las células TEG3 tienen preferencia por SDF1α, se estudió la funcionalidad de las nanofibras para hacer migrar a estas células. Inicialmente se hizo el estudio bajo cubres para comprobar la adhesión de las nanofibras con las TEG3. Conforme pasaba el tiempo, y en aumento de la cantidad de SDF1α, la adhesión era mayor, mientras que en el cubre sin nanofibras con SDF1α no aumentaba la adhesión con las TEG3. Se obtuvieron tasas de migración de OEG de 3 mm de distancia pasados 6 días de estudio (10). De esta forma se comprobó que las células de OEG no tienen preferencia por un sustrato con laminina o con SDF1α, por lo que a continuación se estudió la posibilidad de establecer una guía migratoria directa y concreta para las células de OEG hasta sus posibles dianas, los axones lesionados (10).

Sin embargo, el estudio de nanofibras de PLA para la migración de OEG tiene algunos inconvenientes. El PLA, al ser no natural aunque sí biodegradable, no es del todo propicio para las células de OEG (10). Pese a estos resultados prometedores *in vitro*, es necesario mayor número de estudios experimentales que supongan más tiempo de espera pudiendo así comprobar si puede aumentar la distancia recorrida por las células.

Por otro lado, se han estudiado las nanofibras como propuesta para tratamientos quimioterapéuticos. Estas nanofibras pueden mantener cantidas de fármaco para posteriormente ser liberado de manera controlada y mantenida potenciando así su actividad. Por este motivo, se han utilizado para tratamientos como la reducción en tumores sólidos *in vitro* (63). Sin embargo, las nanofibras con SDF1α no han sido

testadas *in vivo* donde se pueda comprobar su actividad facilitadora en un ambiente inhibitorio característico de la lesión medular (10).

5.3.4 Coadyuvancia en el trasplante de OEG

El trasplante de células de OEG no es la única terapia que se ha probado en pacientes con una lesión medular. El tratamiento multidisciplinar basado en la rehabilitación temprana, a través de actividades impartidas por fisioterapeutas, se combina normalmente con el trasplante (35,49).

La fisioterapia permite un tratamiento terapéutico no farmacológico de gran importancia para el manejo rehabilitador ante cualquier tipo de lesión músculo-nerviosa. Al perderse las conexiones entre las vías superiores e inferiores, se produce atrofia a nivel neuromuscular. Por eso, ante una lesión medular, es necesaria una pronta rehabilitación de la musculatura de las extremidades afectadas a través de actividades que promuevan la máxima recuperación y fortalecimiento, dentro de la limitación producida por las pérdidas en las conexiones neuronales.

De esta forma, en trasplantes de OEG exitosos, se han realizado masajes circulares a las ratas parapléjicas por debajo del nivel de la lesión tratando de evitar la atrofia muscular y favoreciendo la circulación sanguínea. También se realizan otras actividades como flexión-extensión y adducción-abducción con una frecuencia de 25 repeticiones en las articulaciones de dedos, tobillos, rodillas y cadera (35).

Las ratas, además, son sometidas a actividades de campo abierto y con rampa inclinada de una duración de 20 minutos diarios (35,49,51). Estas actividades suelen comenzar un mes después del trasplante de OEG aunque previamente son entrenados antes de ser sometidos a la lesión. Los animales, además, son motivados premiándoles con comida antes y después del ejercicio. Este entrenamiento permite que los animales ya conozcan la actividad previa a la lesión para retomarla cuanto antes, evitando la atrofia muscular y otras complicaciones como úlceras, infecciones urinarias, hematuria, etc (35,50).

Por tanto, la actividad de las células de OEG puede verse influenciada y potenciada por la actividad física y la fisioterapia complementaria.

5.4 Tratamiento seguro de pacientes con OEG

El descubrimiento de las células de OEG desde 1875 y el conocimiento posterior de su actividad en el sistema olfatorio, han despertado mucho interés y ha favorecido su estudio profundo. Los resultados positivos con trasplante de OEG, en la mayoría de los casos con roedores o primates, ha sido un incentivo para dar un paso más en la investigación con la posibilidad de trasplantar las células de OEG a pacientes con lesiones medulares. Como se ha expuesto, el trasplante de la OEG en humanos no ha conseguido los mismo resultados, habiendo una falta de recuperación funcional y la aparición de complicaciones (58,59). Sin embargo, se ha utilizado esta terapia en pacientes sin la seguridad y fiabilidad oportunas:

- El Dr. Hongyun Huang, un neurocirujano en Pekín, China, realizó trasplantes de OEG fetales en más de 400 pacientes con lesiones medulares y en 100 pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en los hospitales de Chaoyang y West Hills (Xishan). Una entrevista con un editor de la revista *Nature* estimó que 3.000 chinos y

1.000 extranjeros “estaban esperando su inyección con estas células”. Se indicaba que no se habían producido complicaciones médicas y que sus pacientes a menudo mejoraban a los 3 días de la cirugía. Los médicos, científicos y reporteros occidentales que desde 2003 visitaron al Dr. Huang no pudieron examinar a los pacientes tratados salvo en los primeros días, no estando confirmadas las modestas mejoras por la operación (59).

- Otro caso con fama mundial fue el del búlgaro Darek Fidyka, que sufría parálisis tras ser agredido con una navaja en 2010. Se considera la primera persona con la espina dorsal casi completamente seccionada que recupera la función motora tras ser tratado por cirujanos polacos y científicos británicos con OEG en 2014. El ensayo consistió en dos intervenciones: una primera operación donde le extirparon uno de los bulbos olfativos para cultivar las células de OEG; y una segunda cirugía, dos semanas después, donde le trasplantaron las células en la médula espinal. Los médicos emplearon unos 100 microinjertos de esas células, tanto por encima como por debajo de la lesión y utilizaron cuatro tiras de tejido nervioso que colocaron en el lado izquierdo de la médula espinal. Tras el trasplante de células, Fidyka realizó un programa de ejercicios de rehabilitación y los resultados se empezaron a obtener a los tres meses, cuando su muslo izquierdo comenzó a desarrollar músculo. Seis meses después de la cirugía, Fidyka pudo dar sus primeros pasos ayudado de barras paralelas y prótesis en las piernas. Dos años después, el paciente podía caminar ayudado de un andador y había recuperado parte de las sensaciones de la vejiga, el intestino y la función sexual (64). Sin embargo, hay expertos que afirman que no existen evidencias científicas claras de que el trasplante de las células de OEG sea el responsable directo de los progresos hechos por Fidyka y tampoco se han dado a conocer otros casos donde el resultado haya sido favorable (65).

- Por último, en nuestro país, se anunció en 2015 en rueda de prensa que se había comenzado a aplicar por primera vez la terapia de “activación medular” con pacientes y que ya estaba dando resultados en un niño que tenía una lesión cervical alta (66). La terapia que se impulsaba privadamente desde el Centro de Innovación Médica en Regeneración Medular (CIMERM) en Elche, comenzaba con un diagnóstico multisistema seguido de tres fases: la primera de terapia de activación medular; la segunda que correspondía al trasplante y, en tercer lugar, la terapia de reinervación y estabilización funcional. Por otro lado, en 2018 la investigadora y responsable médica, con amplia experiencia en OEG, que aplicaba estas terapias, fue detenida en la Operación Summas de la Guardia Civil acusada de estafar más de un millón de euros a 200 personas, cuatro de ellas menores de edad. Por sentirse engañados con tratamientos para curar lesiones medulares, varios pacientes pidieron la investigación por posible fraude y estafa. Estos tratamientos se basaban en terapias homeopáticas y masajes locales junto a otros fármacos sin determinar (67).

Sin embargo, hasta este momento, no hay ninguna publicación científica sobre los resultados obtenidos en estos ensayos. Es por ello que el trasplante de OEG es controvertido y puede generar falsas esperanzas a pacientes especialmente vulnerables por su situación. A pesar de esto, se sigue investigando formalmente el trasplante de OEG para la reparación axonal ya que hay resultados que han sido contrastados y pueden ser prometedores.

6. CONCLUSIONES

Las células de OEG, debido a su función como guía de los axones que acompañan durante todo el camino al nervio olfatorio, son candidatas para el tratamiento en lesiones medulares.

La OEG presenta unas características propias sin embargo comparten ciertas similitudes y marcadores con otras estirpes gliales como astrocitos o células de Schwann. Es por esto que, cultivos de OEG, pueden contaminarse con otras células y alterar los resultados al trasplantarlas en lesiones medulares.

La utilización de células de OEG aporta varias ventajas como su fácil acceso y permitir el autotrasplante. Este tipo de trasplantes evita problemas éticos frente a otras estirpes celulares (células madre, fetos o embriones) y los efectos secundarios (infecciones por inmunosupresión y rechazo).

La cirugía para el trasplante de OEG en animales de experimentación y en pacientes conlleva complicaciones frecuentes como las infecciones.

Se han propuesto diferentes mecanismos por los que la OEG favorecería la reparación de los axones lesionado: la expresión de factores de crecimiento y neutróficos; la promoción de la angiogénesis y la formación de una estructura aislante entre el ambiente inhibitorio generado en la lesión medular. Sin embargo, no se conoce con exactitud cuál o cuáles son los mecanismos que esta estirpe glial utiliza en la reparación axonal.

Hay variables que influyen negativamente en la reproducibilidad de los experimentos como son las distintas fuentes de extracción de la OEG, las diferencias de edad en los animales de experimentación, los métodos de cultivo y las estrategias del trasplante.

Las células TEG3 proporcionan una mayor accesibilidad y estabilidad, frente a la aparición de procesos oncogénicos, con respecto a las células de OEG procedentes de cultivos primarios.

La modificación de la enzima telomerasa en las células de OEG podría evitar el proceso de senescencia y les proporcionaría estabilidad.

Los resultados obtenidos *in vitro* de migración y adhesión al combinar nanofibras de PLA con las células de OEG hace pensar que son aplicables como coadyuvantes también *in vivo*.

Los resultados exitosos de trasplante de OEG en animales de experimentación indican que deben estar acompañados de una rehabilitación temprana tras producirse la lesión, ya que mejora la actividad reparativa y evita los efectos secundarios como la atrofia.

Las últimas noticias con respecto a los trasplantes de OEG en pacientes indican que su aplicación en lesiones medulares se tenga que realizar con mucha prudencia. Estas lesiones medulares, a día de hoy irreparables, conllevan un tratamiento multidisciplinar con gran afectación autonómica, psicológica y socioeconómica del paciente.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pawlina W. Ross MH. Histología-texto y atlas. 7ª Edición. Lippincott Williams & Wilkins; 2015.

2. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): Función y caracterización molecular. Neurologia. 2015;30(2):119–29.

3. Schuller R. La sclérose en plaques. La Recherche.1987;1(191)

4. Weerts E, Wyndaele JJ. Accessibility to spinal cord injury care worldwide: The need for poverty reduction. Spinal Cord. 2011;49(7):767.

5. Brück W, Brück Y, Maruschak B, Friede RL. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. Acta Neuropathol. 1995 Apr;89(4):363–7.

6. Fisher CG, Noonan VK, Smith DE, Wing PC, Dvorak MF, Kwon B. Motor recovery, functional status, and health-related quality of life in patients with complete spinal cord injuries. Spine (Phila Pa 1976). 2005;30(19):2200–7.

7. López Prats F. Lesiones nerviosas periféricas. Síndromes canaliculares. McGrawhill Interamericana. 2ª Edición.México; 2001.

8. Poage C, Roth C, Scott B. Peroneal Nerve Palsy: Evaluation and Management. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2016;24(1):1–10.

9. Antonio Pérez-Estudillo C, Sánchez D, Alonso, Leonor López-Meraz M, Morgado-Valle C, Beltran-Parrazal L, et al. Aplicaciones terapéuticas para la lesión de médula espinal. eNeurobiología. 2018;9(21):131118.

10. Lopez-Mengual A. Guía a través de sustratos inhibitorios de células de la glía envolvente del bulbo olfatorio por funcionalización de nanofibras de PLA con SDF1α [tesis]. Universidad politécnica de Valencia; 2016.

11. Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. Experimental Neurology. 2014;253:197–207.

12. Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. Myelin reactive glia and scar-derived CNS axon growth inhibitors: Expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. 2004;46(3): 225–51.

13. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron. 1999;23(2):297–308.

14. Bradbury EJ, Burnside ER. Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. Nature Communications. 2019;10:3879.

15. Löw K, Culbertson M, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Tuszynski MH. Netrin-1 is a novel myelin-associated inhibitor to axon growth. J Neurosci. 2008 Jan 30;28(5):1099–108.

16. Mrkusich EM, Osman ZB, Bates KE, Marchingo JM, Duman-Scheel M, Whitington PM. Netrin-guided accessory cell morphogenesis dictates the dendrite orientation and migration of a Drosophila sensory neuron. Development. 2010 Jul 1;137(13):2227–35.

17. Stein E, Tessier-Lavigne M. Hierarchical organization of guidance receptors: Silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. Science. 2001 Mar 9;291(5510):1928–38.

18. Hagino S, Iseki K, Mori T, Zhang Y, Hikake T, Yokoya S, et al. Slit and glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. Glia. 2003 Apr 15;42(2):130–8.

19. Ramón-Cueto A, Valverde F. Olfactory bulb ensheathing glia: A unique cell type with axonal growth-promoting properties. Glia.1995;14(3):163–73.

20. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. Nat Rev Neurosci. 2003;4(9):703–13.

21. Piantanida AP. Rol de la conexina 43 en las propiedades fisiológicas de la glía envolvente y en la plasticidad de la vía aferente olfatoria [tesis]. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2016.

22. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Lawrence CK, LaMantia AS, McNamara JO and WS. The Olfactory Epithelium and Olfactory Receptor Neurons-Neuroscience. 2a ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2001.

23. Caggiano M, Kauer JS, Hunter DD. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: A lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. Neuron. 1994;13(2):339–52.

24. Beites CL, Kawauchi S, Crocker CE, Calof AL. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. Experimental Cell Research; 2005;306(2):309–16.

25. Graziadei PPC, Graziadei GAM. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. J Neurocytol. 1979 Feb;8(1):1–18.

26. Valverde F, Lopez-Mascaraque L. Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. J Comp Neurol. 1991;307(4):658–74.

27. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. Nat Neurosci. 2003 May 1;6(5):507–18.

28. Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 2005 Jul 21;28(1):223–50.

29. 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 Jun 1;127(2):232–44.

30. Doucette R. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. Glia. 1990;3(6):433–49.

31. Fraher JP. The transitional zone and CNS regeneration. J Anat. 1999 Feb;194(2):161–82.

32. Navarro X, Valero A, Gudiño G, Forés J, Rodríguez FJ, Verdú E, Pascual R, Cuadras J N-SM. Ensheathing glia transplants promote dorsal root regeneration and spinal reflex restitution after multiple lumbar rhizotomy. Ann Neurol. 1999;45(2):207–15.

33. Barnett SC, Chang L. Olfactory ensheathing cells and CNS repair: Going solo or in need of a friend? Trends Neurosci. 2004;27(1):54–60.

34. Gómez R, Neira A, Tovar D, Martínez C, Bernal JE. Células de glía envolvente olfatoria: potencial para la reparación de lesiones del sistema nervioso central. Univ . 2007;48(4);396–413.

35. Muñoz-Quiles C. Trasplante de glia envolvente olfatoria para reparar lesiones crónicas de la médula espinal de ratas adultas: de roedores a primates [tesis].CSIC - Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV); 2007.

36. Liesi P. Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. Embo J. 1985 Oct;4(10):2505–11.

37. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, Connexons, and Intercellular Communication. Annu Rev Biochem. 1996 Jun 28;65(1):475–502.

38. Rela L, Bordey A, Greer CA. Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. Glia. 2010 Apr 15;58(6):665–78.

39. Mori S, Leblond CP. Identification of microglia in light and electron microscopy. J Comp Neurol. 1969;135(1):57–79.

40. Doucette JR. The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. Anat Rec. 1984;210(2):385–91.

41. Morrison EE, Costanzo RM. Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. Microsc Res Tech. 1992;23(1):49–61.

42. Vincent AJ, West AK, Meng IC. Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. J Neurocytol. 2005 Mar;34(1–2):65–80.

43. Franssen EHP, de Bree FM, Verhaagen J. Olfactory ensheathing glia: Their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. Brain Res. 2007 Nov;56(1):236–58.

44. Muñetón-Gómez VC, Taylor JS, Nieto Sampedro M. Mecanismos involucrados en la promoción de crecimiento axonal por la glia envolvente del bulbo olfatorio. Biomédica. 2001 Jun 1;21(2):172.

45. Nadine Goodman M, Silver J, Jacobberger JW. Establishment and neurite outgrowth properties of neonatal and adult rat olfactory bulb glial cell lines. Brain Res. 1993 Aug 13;619(1–2):199–213.

46. Doucette R. PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. J Comp Neurol. 1991;312(3):451–66.

47. Kafitz KW, Greer CA. Role of laminin in axonal extension from olfactory receptor cells. J Neurobiol. 1997 Mar;32(3):298–310.

48. Moreno-Flores MT, Bradbury EJ, Martín-Bermejo MJ, Agudo M, Lim F, Pastrana É, et al. A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. Mol Ther. 2006 Mar;13(3):598–608.

49. Li Y, Decherchi P, Raisman G. Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. J Neurosci. 2003 Feb

1;23(3):727–31.

50. DeLucia TA, Conners JJ, Brown TJ, Cronin CM, Khan T, Jones KJ. Use of a cell line to investigate olfactory ensheathing cell-enhanced axonal regeneration. Anat Rec - Part B New Anat. 2003 Mar 1;271(1):61–70.

51. Lu J, Féron F, Ho SM, Mackay-Sim A, Waite PME. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. Brain Res. 2001 Jan 19;889(1–2):344–57.

52. Dombrowski MA, Sasaki M, Lankford KL, Kocsis JD, Radtke C. Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells. Brain Res. 2006 Dec 13;1125(1):1–8.

53. Franklin RJM. Remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. Anat Rec. 2003 Mar 1;271B(1):71–6.

54. Takami T, Oudega M, Bates ML, Wood PM, Kleitman N, Bunge MB. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. J Neurosci. 2002 Aug 1;22(15):6670–81.

55. Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. Neuron. 2000 Feb 1;25(2):425–35.

56. Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. J Neurosci. 2005 Nov 16;25(46):10700–11.

57. Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, Lankford KL, Wewetzer K, Fodor WL, et al. Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. Faseb J. 2004 Feb 4;18(2):335–7.

58. Féron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. Brain. 2005 Dec;128(12):2951–60.

59. Dobkin BH, Curt A, Guest J. Cellular transplants in China: Observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. Neurorehabil Neural Repair. 2006 Mar 30;20(1):5–13.

60. Moreno-Flores MT, Lim F, Martín-Bermejo MJ, Díaz-Nido J, Ávila J, Wandosell F. Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. J Neurochem. 2003;85(4):861–71.

61. Rubio MP, Ramón A, Blasco MA. Glia envolvente olfatoria modificada genéticamente mediante introducción de telomerasa [Internet]. Madrid, España; 2005 [citado 28 Abril 2020]. Disponible en: https://digital.csic.es/handle/10261/5568

62. Llamusí MB, Rubio MP, Ramón-Cueto A. Telomerase protects adult rodent olfactory ensheathing glia from early senescence. Exp Neurol. 2011 May;229(1):54–64.

63. Contreras-Cáceres R, Cabeza L, Perazzoli G, Díaz A, López-Romero JM, Melguizo C, et al. Electrospun nanofibers: Recent applications in drug delivery and cancer therapy. Nanomaterials. 2019 Apr 24;9(4):656.

64. El Universo:Hombre con parálisis vuelve a caminar gracias a tratamiento pionero [Internet]. 2014 [citado 21 May 2020]. Disponible en: https://www.eluniverso.com/vida-estilo/2014/10/21/nota/4131566/hombre-paralisis-vuelve-caminar-gracias-tratamiento-pionero

65. Kioskoymas.ABC: Andreu J. La última esperanza para los parapléjicos [Internet]. 2014 [citado 21 May 2020]. Disponible en: http://kioskoymas.abc.es/noticias/sociedad/20141109/abcp-ultima-esperanza-para-paraplejicos-20141109.html

66. Infosalus: Nueva terapia regenerativa medular en pacientes españoles [Internet]. 2015 [citado 21 May 2020]. Disponible en: https://www.infosalus.com/asistencia/noticia-nueva-terapia-regenerativa-medular-pacientes-espanoles-20150218121028.html

67. El País:La investigadora Almudena Ramón, detenida por estafas con falsas terapias para lesiones medulares [Internet]. 2018 [citado 15 May 2020]. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2018/05/31/ciencia/1527754216_362287.html