



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Transplante de células olfativas (Olfactory Ensheathing Cells). Mudança de paradigma no tratamento de lesões medulares?

Pedro Afonso Fernandes Batista

MAIO'2018



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

Transplante de células olfativas (Olfactory Ensheathing Cells). Mudança de paradigma no tratamento de lesões medulares?

Pedro Afonso Fernandes Batista

Orientado por:

Dr. Marco Alveirinho Simão

MAIO'2018

Resumo

As lesões traumáticas da medula espinhal são atualmente um problema de saúde importante, nomeadamente por afetar muitos indivíduos durante a sua vida ativa, condicionando uma redução drástica da sua qualidade de vida. Quando ocorre uma lesão medular, há uma diminuição da transmissão do sinal eléctrico através das vias medulares ascendentes e descendentes, devido a uma interrupção física dos feixes neuronais, mas também devido ao microambiente que se forma no local de lesão, altamente inibitório da regeneração neuronal. Esta diminuição parcial ou total da transmissão do sinal eléctrico manifesta-se clinicamente por uma redução ou abolição das capacidades sensitiva e motora abaixo do nível de lesão. As terapêuticas para as lesões medulares traumáticas oferecidas pela medicina atual são muito limitadas quer em diversidade, quer em eficácia. Assim, urge a necessidade de novas terapêuticas capazes de mudar o paradigma da abordagem a esta situação clínica.

O sistema nervoso olfativo (SNO) possui uma capacidade regenerativa inata, visto estar em contacto com o meio externo, onde existem partículas nocivas como gases e poeiras, que danificam o SNO. Para que o indivíduo mantenha o seu olfato intacto, é necessário que este sistema regenere, razão pela qual o SNO adquiriu essa capacidade ao longo de milhões de anos de evolução. As células embainhantes olfativas (Olfactory Ensheathing Cells – OECs) são células da glia que existem apenas no SNO, onde desempenham funções essenciais ao desenvolvimento e regeneração neuronais, existindo evidência de que poderão contribuir para a regeneração da medula espinhal.

Foram realizados diversos estudos, quer em modelos animais, quer em humanos para investigar a eficácia do transplante de OECs em contexto de lesão da medula espinhal, com resultados promissores. O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

Palavras-chave:

Células embainhantes dos axónios olfativos (*Olfactory ensheathing cells* - OEC's); Mucosa Olfativa; Bulbo olfativo; Lesão Medular; Transplante celular; Sistema Nervoso Olfativo

Abstract

Traumatic spinal cord injury is currently an important health problem, particularly as it affects many individuals during their active lives, resulting in a drastic reduction in their quality of life. When a spinal cord injury occurs, there is a decrease in electrical signal transmission through ascending and descending spinal cord pathways, due to a physical interruption of the neural bundles, but also due to the microenvironment that forms at the site of injury, highly inhibitory to neuronal regeneration. This partial or total decrease in electrical signal transmission is clinically manifested by a reduction or abolition of sensory and motor capacities below the level of injury. The therapies for traumatic spinal cord injuries offered by current medicine are very limited in both diversity and efficacy. Thus, there is an urgent the need for new therapies capable of changing the paradigm of the approach to this clinical situation.

The olfactory nervous system (ONS) has an innate regenerative capacity, since it is in contact with the external environment, where there are noxious particles such as gases and dust, which persistently damage the ONS. In order for the individual to keep his sense of smell intact, this system needs to regenerate, which is why the ONS has acquired this ability over millions of years of evolution. Olfactory Ensheating Cells (OECs) are glial cells that exist only in the ONS, where they play essential roles in the neural development and regeneration, and are believed to contribute to regeneration of the spinal cord.

Several studies have been conducted, both in animal models and in humans to investigate the efficacy of transplantation of OECs in the context of spinal cord injury, with promising results. This review expresses the author's opinions, and not FML's.

Key-words:

Olfactory Ensheating Cells; Olfactory Musosa; Olfactory bulb; Celular Transplant; Spinal Cord Injury; Olfactory Nervous System.

Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Métodos de Revisão.....	4
Introdução.....	4
Lesões da Medula Espinhal	5
Fisiopatologia das Lesões Medulares.....	6
Sistema Nervoso Olfativo: Um Sistema Em Permanente Regeneração.....	8
Propriedades das Olfactory Ensheathing Cells.....	9
OECs: Um Grupo Heterogéneo de Células	10
Vantagens das OECs face às Células de Schwann	12
Estudos e Ensaio Clínicos Realizados Com OECs	12
Discussão	19
Agradecimentos	20
Bibliografia	21

Métodos de Revisão

Esta revisão reúne informação patente em vinte e seis (26) artigos, publicados até 2018, disponíveis em PUBMED.com através da pesquisa das palavras-chave:

Olfactory mucosa; Olfactory Ensheathing Cells; Transplant; Spinal cord injury; Olfactory Nervous System; Neuronal Regeneration.

Introdução

Uma lesão traumática da medula espinhal causa uma diminuição das capacidades motoras e sensitivas abaixo do nível de lesão e, conseqüentemente, uma marcada redução da qualidade de vida do indivíduo. Após a lesão, além da destruição direta das vias medulares ascendentes e descendentes, ocorrem diversos processos que impedem a regeneração neuronal, razão pela qual o potencial de recuperação funcional é muito reduzido. Atualmente, não existem terapêuticas eficazes para esta situação clínica.

Os neurónios do Sistema Nervoso Olfativo (SNO) têm uma vida de apenas um a três meses. Assim, o SNO precisa de estar em constante regeneração neuronal, para que o olfato se mantenha intacto. As Olfactory Ensheathing Cells (OECs) têm um papel essencial na promoção da regeneração neuronal no SNO, e existe evidência de que, quando transplantadas para a medula espinhal, promovem a regeneração neuronal nesse local, e conseqüente recuperação funcional.

Nesta revisão, serão abordados os processos que ocorrem na medula espinhal após lesão, que impedem que os neurónios regenerem espontaneamente, assim como as características das OECs que as tornam candidatas aliantes ao tratamento dessas lesões. Serão também apresentados alguns ensaios clínicos já realizados nesta área, com resultados promissores.

Lesões da Medula Espinhal

As lesões traumáticas da medula espinhal apresentam-se atualmente como um problema importante a nível global, devido ao seu grande impacto na qualidade de vida do indivíduo, na economia, devido aos custos consideráveis associados a cuidados de saúde primários, e pela sua prevalência em indivíduos relativamente jovens. Estima-se uma prevalência a nível global de 2.5 milhões de casos de lesões da medula espinhal, com uma incidência anual de 130000 novos casos. Nos EUA, estima-se que existam 10000 indivíduos com menos de 30 anos que sofrem desta patologia. ^[1]

Uma lesão da medula espinhal pode resultar de contusão, compressão, penetração ou laceração da coluna vertebral, e consequente morte celular, nomeadamente de neurónios, oligodendrócitos, astrócitos, e células precursoras. Isto provoca uma perda total ou parcial das funções sensitiva, motora, e autonómica abaixo do nível da lesão, devido ao comprometimento da vasculatura local, e à interrupção das vias neuronais ascendentes e descendentes. Além das perdas de capacidade funcional e sensitiva, vários outros sistemas podem ser afetados. A lesão pode até ser fatal através de mecanismos como infeções torácicas, hipóxia devido a paralisia de músculos respiratórios, assistolia cardíaca devido a perda de inervação simpática do coração, e disreflexia autonómica (que se traduz numa subida descontrolada da pressão arterial). A maioria dos doentes também sofre de incontinência urinária e intestinal, necessitando por isso de controlo sintomático e cuidados especializados para o resto da sua vida. ^[2]

Além da imobilização e intervenção cirúrgica precoce que visam impedir a progressão da lesão, a única terapêutica sugerida no contexto de lesão da medula espinhal, é a administração de metilprednisolona, sendo que mesmo esta é controversa, e raramente aplicada devido à falta de evidência de benefícios a longo prazo. ^[2]

Dada a falta de alternativas viáveis no que toca ao tratamento destes doentes, e tendo em conta a gravidade da patologia em questão, urge a necessidade de inovar e investigar potenciais soluções para esta situação. Neste contexto, tem suscitado grande interesse na comunidade científica o potencial terapêutico do transplante autólogo de células da mucosa nasal para o local de lesão medular. As OECs têm um papel preponderante na regeneração neuronal que se verifica neste contexto.

Fisiopatologia das Lesões Medulares

Ao estudar o ambiente medular local após lesão, verifica-se que existem duas fases de lesão:

Fase primária (mecânica):

Nesta fase, ocorre interrupção mecânica da arquitetura normal da medula espinhal. A lesão de células da glia, e a desmielinização das vias espinhais, provoca uma descontinuidade anatômica das vias medulares. A extensão do impacto inicial e o grau de lesão neuronal nesta fase são fatores cruciais para determinar as consequências da lesão, a nível funcional. Observam-se também edema e hemorragia, que provocam hipotensão sistémica, isquémia, desregulação da homeostase iónica, e acumulação de neurotransmissores no local da lesão. A acumulação de glutamato, um neurotransmissor excitatório do SNC, provoca morte de neurónios (através de excitotoxicidade) e causa um bloqueio axonal significativo, contribuindo para os défices sensitivos e motores observados nestes doentes.^{[3][2]}

Fase secundária (bioquímica e vascular):

Esta fase inicia-se minutos após a lesão, e dura entre semanas a meses. Durante a fase secundária ocorre:

- Uma resposta inflamatória mediada por células do sistema imunitário tais como neutrófilos, macrófagos, microglia, e linfócitos T. Estas células libertam citocinas como TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e fatores de crescimento, que contribuem para o processo inflamatório. Esta cascata de reações permite a limpeza de detritos celulares no local da lesão, mas exacerba também a lesão ao danificar células nervosas normais.
- Formação de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio, devido ao aumento dos níveis de cálcio intracelular, disfunção mitocondrial, e degradação do ácido araquidónico. Estas espécies reativas de oxigénio e nitrogénio contribuem para a lesão celular.^[3]
- Acumulação de glutamato: O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC, é libertado em excesso após uma lesão medular, provocando morte celular por excitotoxicidade, processo complexo que inclui a formação de espécies de oxigénio, isquémia, e influxo de Ca^{2+} para dentro das células.^[3]

- Formação de uma cicatriz glial, um processo multifactorial que resulta da acção de diversas células como astrócitos, macrófagos, e fibroblastos. A cicatriz glial é uma região rica em moléculas inibitórias de crescimento como proteoglicanos de sulfato de condroitina, que impedem que ocorra regeneração neuronal no local de lesão. A cicatriz glial constitui uma barreira física e química que os neurónios medulares não conseguem ultrapassar (fig 1). [4][5]

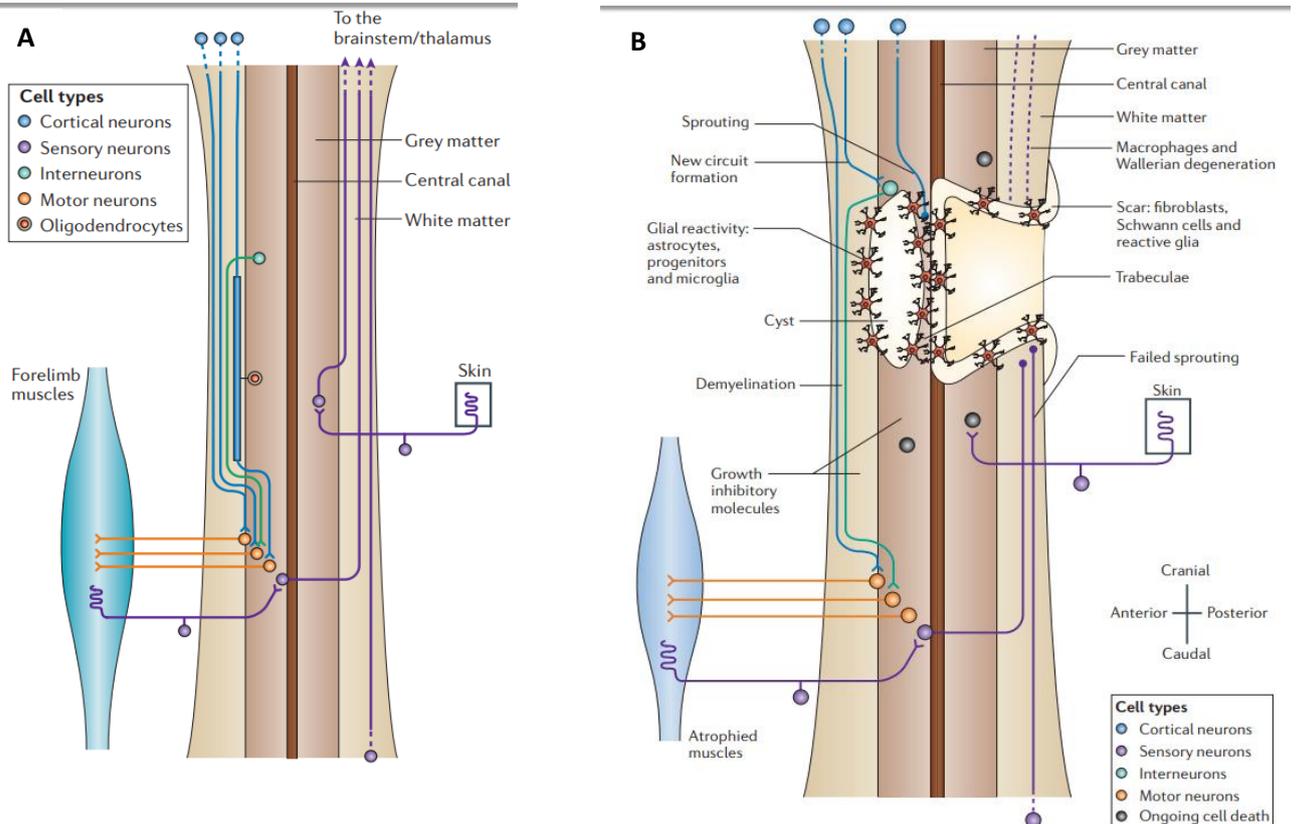


Figura 1 Esquemas representativos da medula espinhal em visão sagital. **A:** Medula espinhal normal; **B:** Medula espinhal com uma lesão a nível cervical. (Imagem original no artigo *Thuret et al*, 2006)

Todos estes processos contribuem para que, durante a fase secundária de lesão, se forme um microambiente altamente inibitório do crescimento neuronal, sendo esta a principal razão pela qual os neurónios do SNC são incapazes de regenerar. [6, 7] De facto, há evidência de que, mesmo no adulto, os neurónios do SNC possuem uma capacidade considerável de reorganização e regeneração, quando colocados num ambiente propício.[8][9] A chave para a regeneração do SNC está em alterar o microambiente após a lesão.

Sistema Nervoso Olfativo: Um Sistema Em Permanente Regeneração

No adulto, o sistema nervoso olfativo é constituído pela mucosa olfactiva, que contém os neurónios olfativos primários, e o bulbo olfativo que pertence ao SNC. Os neurónios olfativos primários surgem de células estaminais que residem no epitélio da cavidade nasal. Os seus axónios estendem-se através da camada basal do epitélio e convergem em fascículos (feixes de axónios), constituindo o nervo olfativo, altamente ramificado, que termina no bulbo olfativo. Durante a vida de um mamífero, os nervos sensoriais olfativos morrem de forma regular como consequência da sua exposição ao ambiente externo, e são substituídos por novos neurónios que se estendem até ao bulbo olfativo, onde formam novas sinapses. De facto, os neurónios olfativos têm uma vida de apenas um a três meses. Depois de sofrerem apoptose, é necessário que estes neurónios sejam substituídos por outros, e esta necessidade leva a que o sistema nervoso olfativo esteja em constante regeneração ao longo da vida. As Olfactory Ensheathing Cells (OECs), ou Células Embainhantes Olfativas, são células da glia que existem no sistema nervoso olfativo, e possuem características únicas que as tornam são essenciais no processo de regeneração neuronal.^[6, 10, 11]

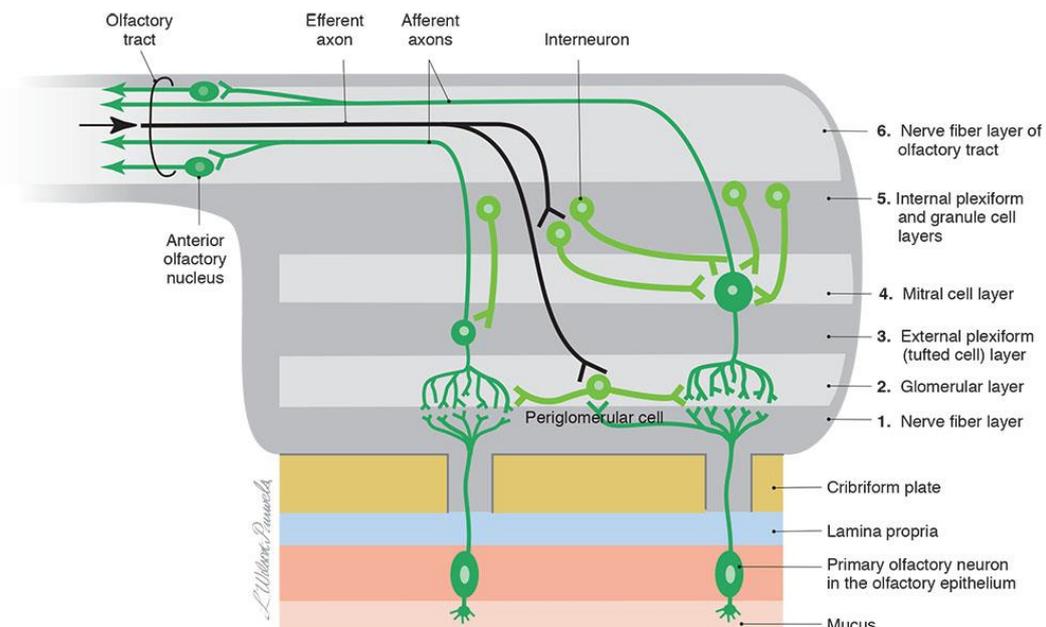


Figura 2 | Representação esquemática do Sistema Nervoso Olfativo. Os números 1-6 representam o bulbo olfativo. Imagem disponível em <https://bmc.med.utoronto.ca/cranialnerves/illustrations-by-chapter/olfactory-i>

Propriedades das Olfactory Ensheathing Cells

As OECs desempenham diversas funções no sistema nervoso olfativo. Na mucosa olfativa, as OM-OECs (olfactory mucosa olfactory ensheathing cells) contribuem para que exista um ambiente favorável ao desenvolvimento de axónios sensoriais, que se organizam em fascículos, e formam o primeiro par craniano. As OECs rodeiam e acompanham esses neurónios ao longo do seu trajeto desde a mucosa olfativa, atravessando a placa cribiforme, e terminando no bulbo olfativo, onde estes estabelecem novas sinapses. Os prolongamentos citoplasmáticos das OECs envolvem esses grupos de axónios, conferindo proteção e impedindo que estes contactem com fatores inibitórios de crescimento que impediriam o crescimento axonal. Na camada externa do bulbo olfativo (camada de fibras nervosas), os nervos olfativos primários passam a ser desfasciculados, dividem-se em subtipos específicos, e projetam-se nos seus alvos topográficos. Além disso, as OECs diferenciam-se em OB-OECs (olfactory bulb olfactory ensheathing cells), que têm propriedades diferentes das OM-OECs. [6, 10, 12, 13]

Os mecanismos através dos quais as OECs contribuem para a regeneração neuronal, ainda não são completamente compreendidos.^[14] No entanto, são conhecidas diversas moléculas expressas pelas OECs que contribuem para este processo. Elas libertam factores difusíveis (neurotrofinas) que têm um papel importante no desenvolvimento neuronal, promovendo a proliferação e crescimento de neurónios. Alguns dos factores difusíveis libertados pelas OECs já foram identificados: *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF), *nerve growth factor* (NGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF), e *insulin-like growth factor* (IGF).^{[6][10][14][15]} Além disso, as moléculas envolvidas na adesão entre glia e axónios, como *Neuron Cell Adhesion Molecule* (NCAM) e N-caderina, são expressas na superfície das OECs. Estas expressam ainda proteínas da matriz extracelular como laminina, fibronectina e colagénio tipo IV. Produzem ainda proteases, como a metaloproteinase-2, assim como *wingless-type mouse mammary tumor virus* (MMTV) e *integration site family, member 4* (Wnt-4). Todas estas moléculas promovem o crescimento axonal.^[10] As OECs expressam ainda citocinas, que têm um papel importante na neuroprotecção e regeneração, como a inter-leucina 6 (IL-6), a fractalquina (CX3CL1) e o *transforming growth factor* β 3 (TGF β 3).^[14]

Sabe-se que, no seu ambiente endógeno, as OECs têm capacidades fagocíticas, nomeadamente de restos celulares. Os detritos axonais de neurónios mortos são fatores inibidores da regeneração neuronal. Assim, a remoção rápida desses detritos é essencial na criação de um ambiente permissivo da regeneração neuronal. As OECs são essenciais nesse processo. Foi também demonstrado que podem fagocitar bactérias (*E. coli* e *B. thailandensis*) *in vitro*, conferindo, assim, protecção contra infeções bacterianas. Todas estas características tornam as OECs excelentes candidatos para terapias de regeneração neuronal, sendo por isso uma das estratégias mais promissoras disponíveis para aumentar regeneração axonal e recuperação funcional após danos ao sistema nervoso, incluindo lesão medular. [6][15]

OECs: Um Grupo Heterogéneo de Células

Vimos que as OECs existem tanto no SNP (OM-OECs) como no SNC (OB-OECs), e que expressam uma panóplia de moléculas que contribuem para a regeneração neuronal. No entanto, a expressão dessas proteínas depende do estado de diferenciação e do local onde se encontram as OECs. De facto, existe evidência de que a expressão genética das OM-OECs é diferente das OB-OECs. Por exemplo, as OM-OECs expressam, diversos genes implicados na produção de colagénio, nomeadamente, *col2a1*, *colla2*, *col9a1* e *colla1*. Além disso, encontramos expressão de TGF-beta 3, relacionado com a síntese de fibronectina. Isto indica que as OM-OECs, ao contrário das OB-OECs, são capazes de regular a matriz extracelular, o que pode explicar a sua grande capacidade migratória. Por outro lado, embora ambos os tipos celulares expressem caderinas, essenciais para ao processo de adesão intercelular, verificamos que expressam tipos diferentes. As OM-OECs expressam caderina 13 e 22, enquanto as OB-OECs expressam caderina 1, 2, 6, 10 e 19. Esta diferença poderá manifestar-se por relações distintas com outros tipos celulares, nomeadamente astrócitos. Como estas, há muitas outras diferenças genéticas entre as OM-OECs e as OB-OECs, que explicam as suas diferentes funções no SNO. [14, 16].

Estudos mostram que as OM-OECs guiam os axónios até aos seus alvos no bulbo olfativo. No bulbo, a camada de fibras nervosas consiste numa camada interna e uma camada externa, ambas populadas por OB-OECs. Na camada externa, as OECs facilitam

a desfasciculação dos feixes de axónios que depois se estendem até à camada de fibras interna, onde as OECs estão envolvidas na refasciculação de axónios dependendo do tipo de recetor de odor que eles expressam. Assim, as OM-OECs estão ligadas à promoção de adesão célula a célula e extensão de axónios em feixes, enquanto as OB-OECs olfativo contribuem para comportamentos celulares mais complexos e variáveis ainda não completamente compreendidos.^[6, 12, 13]

Além da variação na expressão de genética e nas funções que desempenham, as OECs podem também apresentar diversas morfologias, incluindo bipolar, tripolar e plana, e a morfologia que apresentam está directamente relacionada com o meio em que se encontram. Quando estudadas *in vitro*, foram descritas duas subpopulações de OECs:
[2][6][10][14]

- *Schwann-like*, que se apresentam com morfologia fusiforme semelhante às células de Schwann e expressam p75NTR e FGAP (Não expressam E-NCAM).
- *Astrocyte-like*, que se apresentam como células achatadas semelhantes aos astrócitos, e expressam GFAP e E-NCAM (Não expressam p75NTR).^[14]

Sabe-se que as OECs são células migratórias, e o mero processo de migrar pode provocar alterações morfológicas na célula. De facto, para que essa migração ocorra é necessário que ocorram ondas lamelipoidais. Essa reorganização do citoesqueleto leva à formação de diferentes fenótipos com morfologias achatadas ou fusiformes, produzindo subpopulações únicas de OECs que podem transformar-se espontaneamente entre uma e outra.^{[10][14]} Foi demonstrado que as OECs são capazes de mudar a sua forma de fusiforme para plana (e vice-versa) em menos de uma hora após uma mudança do meio de cultura onde se inserem.^[6]

Assim, as OECs não são uma população uniforme de células. A sua função e morfologia dependem do meio em que se encontram. Há pelo menos 2 tipos celulares definidos, OM-OECs e OB-OECs, que têm comportamentos diferentes e papéis distintos no sistema nervoso olfativo. Falta ainda definir qual o papel de cada tipo celular após transplantação, e qual a subpopulação ideal para terapias de reparação neuronal.^[6]

Vantagens das OECs face às Células de Schwann

As OECs apresentam diversas características que as tornam superiores às células de Schwann como candidata a transplante para regeneração de tecido nervoso medular:

- No nervo olfativo, as OECs rodeiam grandes feixes de axónios com os corpos celulares das OECs localizadas maioritariamente no exterior dos fascículos com prolongamentos celulares que penetram entre os axónios. Pelo contrário, as células de Schwann no nervo trigémio embrulham axónios individuais ou pequenos grupos de axónios. ^[6]
- As OECs integram-se nas vias neuronais periféricas e centrais. Esta propriedade deve-se ao facto de que elas estão normalmente presentes na interface SNP-SNC no sistema nervoso olfativo. (contrariamente às células de Schwann que existem apenas no SNP e os astrócitos que existem apenas no SNC). ^[6]
- As OECs estendem-se sempre à frente dos axónios olfativos, permitindo-nos assumir que as OECs guiam os axónios ao longo de um percurso definido, ao contrário das células da glia existentes no restante SNP, como células de Schwann, que seguem percursos que já contêm axónios, durante o desenvolvimento. ^[6]
- Após a transplantação, as células de Schwann mielinizam axónios individuais, mas não migram muito para o local de lesão, e não se integram bem com as outras células do SNC, ao contrário das OECs que possuem a capacidade de se associar livremente a outros tipos celulares, como os astrócitos. ^{[6][15]}

Estudos e Ensaios Clínicos Realizados Com OECs

Os neurónios olfativos têm capacidade regenerativa, e as OECs desempenham um papel fundamental nesse processo. Assim, é lógica a hipótese de que estas podem facilitar o crescimento axonal do SNC após lesão. Nos últimos anos, o uso de OECs para tratar lesões medulares, foi estudado extensivamente, e de facto, vários estudos em diferentes modelos confirmaram sua capacidade regenerativa em resposta a lesões medulares^[17]

A sua capacidade regenerativa deve-se a uma combinação de vários fatores, já abordados anteriormente, nomeadamente: A sua capacidade de guiar e proteger os

axónios, produção de factores pró-regenerativos, diminuição da resposta inflamatória, diminuição do tamanho da cicatriz glial, estimulação da angiogénese. Em suma, as OECs transformam um ambiente inibitório num ambiente permissivo de regeneração, que se traduz em regeneração axonal e, conseqüentemente, melhoria funcional. De facto, um dos primeiros estudos de transplante de OECs em lesões completas da medula espinhal mostrou que, após sete meses, os ratos transplantados recuperaram a capacidade de usar os seus membros traseiros para escalar, assim como sensibilidade cutânea^[18]. Vários outros estudos em modelos animais confirmaram este potencial de recuperação funcional^[19-21], razão pela qual foi possível proceder a ensaios clínicos em humanos.

Tanto as OECs da mucosa nasal, como as do bulbo, têm capacidade neuroregenerativa, tendo a capacidade de promover uma diminuição no tamanho da lesão e da cavidade no SNC. No entanto, elas exibem propriedades diferentes em termos de promoção e crescimento de vias axonais espinhais, assim como capacidade de integração e migração.^[13] Neste contexto, é necessário estudar ambas as populações para determinar qual a mais eficaz na promoção da regeneração, e conseqüente recuperação funcional.

Em 2006, foi realizado um ensaio clínico levado a cabo por investigadores portugueses, no qual foram realizados transplantes autólogos de células da mucosa nasal em sete doentes com lesões medular score ASIA A (tabela 1).^[22] A razão pela qual se optou por usar doentes com score ASIA A é porque, a probabilidade de uma recuperação espontânea que poderia confundir os resultados do estudo, é extremamente reduzida, assim como a probabilidade de agravar o quadro do doente. Os autores referem diversas vantagens do transplante de células da mucosa nasal, nomeadamente:

- A remoção de parte da mucosa olfativa não danifica permanentemente o olfato do indivíduo, visto tratar-se de um sistema em contínua regeneração;
- A mucosa olfativa é facilmente acessível;
- A probabilidade de rejeição de transplante é nula, visto tratar-se de um transplante autólogo, dispensando por isso o uso de terapêutica imunossupressora.
- Os transplantes de mucosa olfativa evitam o ambiente artificial da cultura de tecidos, o que também reduz os riscos do procedimento;
- Ao utilizar a mucosa olfativa para preencher a cavidade medular com tecido sólido em oposição ao uso de suspensões celulares, há um risco reduzido de células individuais entrarem na circulação do líquido cefalorraquidiano (LCR);

- Durante o período de adaptação ao novo ambiente, as células poderão ser suportadas por células típicas do seu ambiente natural, nomeadamente *stem-like cells*, fibroblastos, e outras células de suporte^[6].

ASIA score	
Grau	Descrição
A	Ausência de funções sensitiva e motora nos segmentos sagrados S4-S5.
B	A função sensitiva, mas não motora, está preservada abaixo do nível neurológico de lesão, e estende-se através dos segmentos sagrados S4-S5.
C	A função motora está preservada abaixo do nível neurológico de lesão, e a maioria dos músculos essenciais abaixo do nível neurológico têm um grau de força muscular inferior a 3.
D	A função motora está preservada abaixo do nível neurológico, e a maioria dos músculos essenciais abaixo do nível neurológico de lesão tem um grau muscular superior ou igual a 3 (é possível mover o membro contra a ação da gravidade).
E	As funções sensitiva e motora estão preservadas.

Tabela 1 | American Spinal Injury Association (ASIA) score

Considero este último ponto extremamente importante, visto que as OECs são células capazes de mudar as suas características consoante o ambiente em que se encontram. Ao transplantar vários tipos celulares da mucosa nasal, é mais provável que elas mantenham as características que as tornam essenciais à regeneração do SNO, características essas que pretendemos manter no ambiente de lesão medular. Neste estudo, os investigadores concluem que o transplante autólogo de enxerto da mucosa nasal é seguro em doentes com lesões completas da medula espinhal (que, aliás, era o principal objetivo a que se tinham proposto). No entanto, obtiveram também resultados estatisticamente significativos no que toca à recuperação sensitiva e motora dos doentes. De facto, todos os doentes foram avaliados periodicamente após a cirurgia e, aos 18 meses, todos apresentaram uma recuperação motora e todos, exceto um, apresentaram melhorias sensitivas. Dois dos sete doentes mudaram do score ASIA A para ASIA C. Além disso, ambos relataram uma recuperação das sensações na bexiga e um desses doentes recuperou ainda a contração voluntária do esfíncter anal. Nas conclusões do estudo, os autores sublinham ainda a importância de uma reabilitação eficaz no período pós cirúrgico. Considerando que, sem qualquer terapêutica, estes doentes manteriam os graves défices motores e sensitivos que

tinham inicialmente, estes resultados são bastante positivos. Os mesmos autores realizaram um ensaio clínico com contornos semelhantes em 2010, desta vez com vinte doentes, no qual onze doentes manifestaram melhoria do score ASIA, e apenas um doente sofreu efeitos adversos (meningite asséptica). Os investigadores confirmaram, assim, que o procedimento é seguro e potencialmente benéfico, necessitando de ensaios clínicos controlados e de maior dimensão.^[23]

Um estudo semelhante foi realizado em 2013 por investigadores polacos, desta vez com um grupo submetido a transplantação de OECs provenientes da mucosa, seguido de reabilitação, e um grupo controlo, que realizou apenas reabilitação.^[24] Ambos os grupos eram constituídos por 3 doentes (T1, T2, T3) com lesões completas da medula espinhal, score ASIA A. Um ano após lesão, obtiveram-se os seguintes resultados nos doentes transplantados: T1 apresentou melhoria funcional significativa, obtendo um score ASIA C, T2 recuperou sensibilidade abaixo da lesão, mas não mobilidade (score ASIA B), T3 manteve o score ASIA A, embora tenha apresentado alguma melhoria, nomeadamente recuperação da sensibilidade em 3 dermatótonos, e aumento da força dos músculos abdominais. Isto mostra que o score ASIA, embora útil, não é ideal para avaliar a recuperação funcional dos doentes. Como esperado, o grupo controlo não obteve qualquer melhoria. Verificamos neste estudo uma recuperação moderada, com uma diferença significativa entre os três indivíduos submetidos à terapêutica.

No entanto, a mucosa olfativa não é a única fonte possível de OECs. Em 2014 foi realizado um estudo no qual foram transplantadas OECs do bulbo olfativo num indivíduo com uma lesão completa da medula espinhal ao nível de T9 (Score ASIA A)^[5]. Os investigadores removeram um dos bulbos olfativos do doente, e usaram-no para criar uma cultura de OECs e fibroblastos, que posteriormente transplantaram para o local de lesão. De referir, no entanto, que além do transplante celular, foram também inseridos quatro tiras de nervo sural autólogo, de forma a conectar as extremidades da lesão, e foi removida a cicatriz glial. Após a cirurgia, o doente realizou reabilitação e, no período de 19 meses após o procedimento, não se verificou qualquer efeito adverso, e registou-se uma melhoria funcional significativa. De facto, O doente passou de score ASIA A para a ASIA C (fig. 3). Houve melhoria da estabilidade do tronco, recuperação parcial dos movimentos voluntários das extremidades inferiores e aumento da massa na coxa esquerda, assim como recuperação parcial da sensibilidade superficial e profunda. Verificaram-se também algumas indicações de recuperação de sensações viscerais e melhoria da auto-regulação

vascular no membro inferior esquerdo. Esta melhoria clínica foi suportada através de um estudo eletrofisiológico (potenciais evocados motores e eletromiografia), mostrando uma recuperação da actividade eléctrica nos músculos reto femoral e extensor dos dedos do pé após contração voluntária e após estimulação cortical (Figura 4).

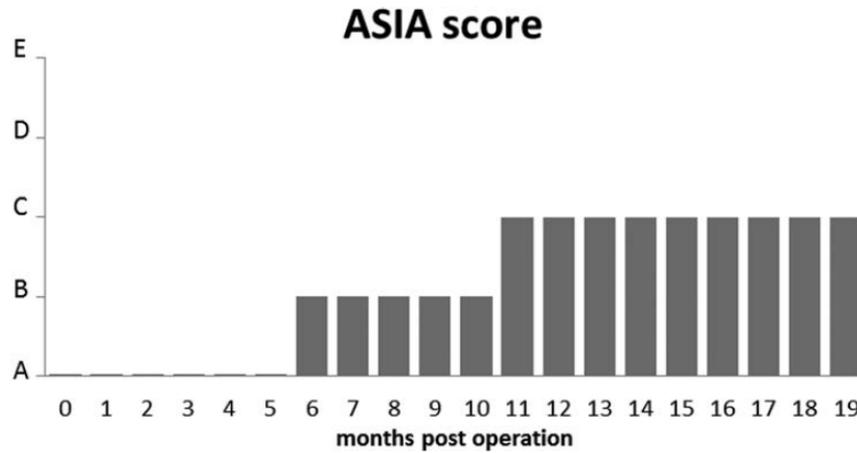


Figura 3 | Progressão do score ASIA no período pós-cirúrgico [5]

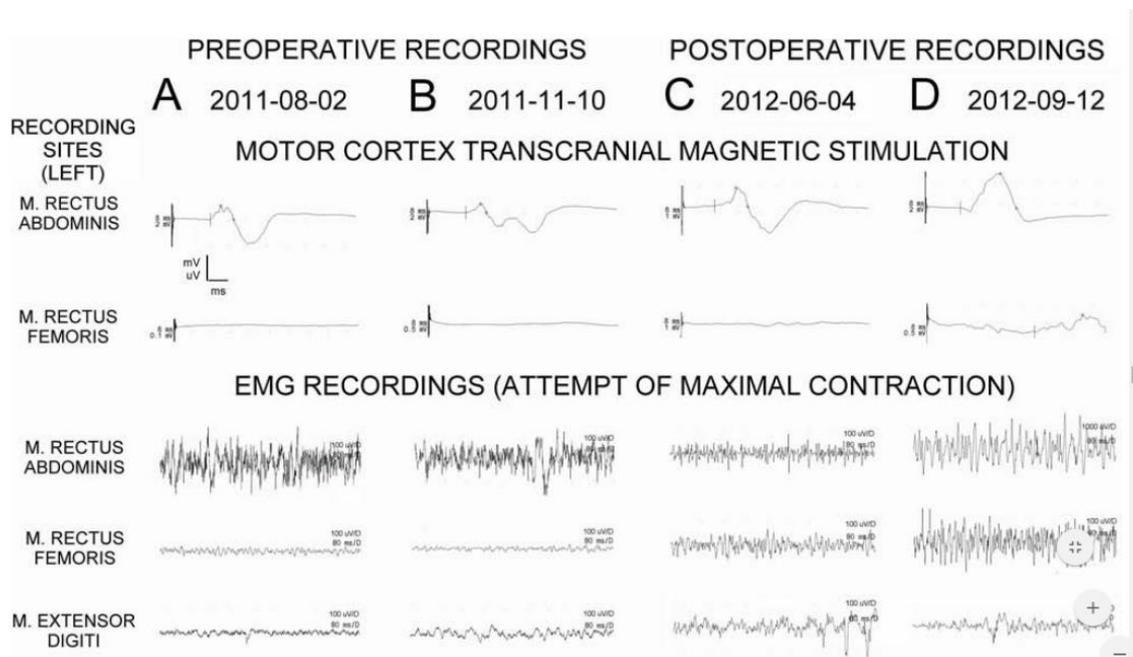


Figura 4 | Comparação pré (A e B) e pós-operatória (C e D) de potenciais evocados motores e eletromiografias. (C – 1 mês após o transplante; D – 5 meses após o transplante) [5]

Este estudo apresenta algumas limitações no que toca ao papel das OECs na recuperação evidente do doente. De facto, vários fatores podem ter contribuído para essa recuperação, nomeadamente a inserção de um enxerto de nervo sural autólogo, a remoção cirúrgica da cicatriz glial, e a reabilitação pós-cirúrgica. No entanto, os autores consideram que essas intervenções não seriam suficientes para explicar uma melhoria tão significativa.

Um dos problemas que se levantam ao fazer comparações entre as várias experiências publicadas, é que foram usadas diferentes fontes de OECs em cada experiência: Células da mucosa olfativa, ou do bulbo. Foi demonstrado que as OECs periféricas têm comportamentos diferentes no crescimento axonal quando comparadas com as OECs centrais, mas ainda não foi determinado qual a subpopulação de OECs com maior potencial para terapias de regeneração neuronal.^[6]

De modo a tentar esclarecer esta questão, foi realizado um estudo no qual foi efetuada uma deservação motora seletiva dos músculos laríngeos através de uma secção seguida de anastomose do nervo laríngeo recorrente em ratinhos.^[12] Depois procederam ao transplante de OECs para 3 grupos distintos de ratinhos: um transplantado com OM-OECs, outro com OB-OECs, e outro com ambos os tipos celulares. Foram ainda constituídos dois grupos de controlo: um no qual não foi seccionado o nervo, e outro no qual o nervo foi seccionado, mas não foram submetidos a transplante celular. Cada grupo era constituído por uma população de dez indivíduos. Dois meses após o procedimento, foram analisadas a amplitude de movimento das cordas vocais e a recuperação funcional de cada um dos grupos, através de videolaringoscopia. Verificaram-se os resultados apresentados na fig. 5.

Dos resultados, retiram-se 3 conclusões importantes:

- Todos os grupos transplantados apresentaram melhoria funcional, o que é compatível com a premissa de que todas as OECs têm potencial regenerativo;
- As OB-OECs foram superiores às OM-OECs em todos os parâmetros analisados;
- O grupo com maior recuperação funcional foi aquele em que os ratinhos foram transplantados com ambos os tipos celulares, sugerindo que exista um efeito sinérgico entre as OM-OECs e as OB-OECs no seu potencial regenerativo.

Assim, este estudo sugere que, em vez de optar entre OM-OECs e OB-OECs, talvez a melhor opção seja usar ambas.

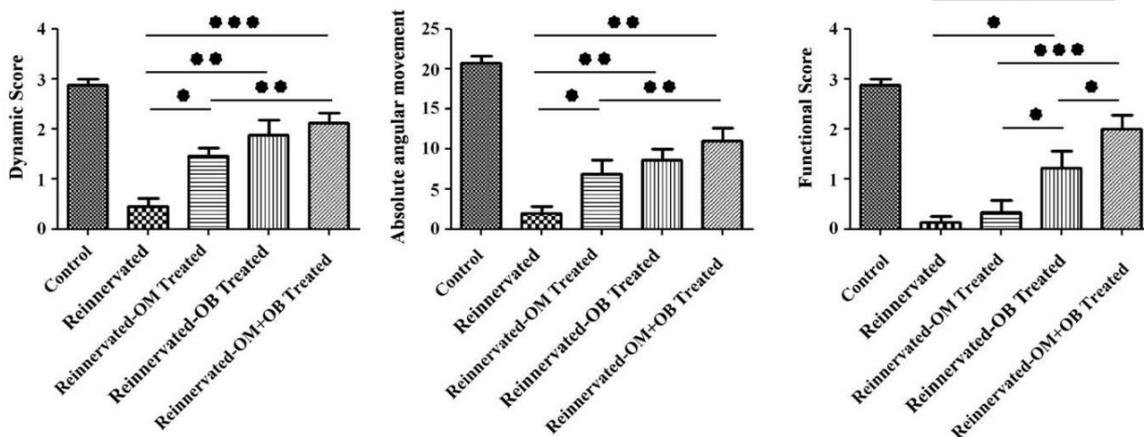


Fig. 5] Resultados do estudo: análise da amplitude de movimentos das cordas vocais e da recuperação funcional de cada um dos grupos, dois meses após o procedimento.

Por todas as suas características, e pelos resultados obtidos nos estudos e ensaios clínicos realizados, é claro que as OECs são células extraordinárias no que toca à promoção de regeneração neuronal. No entanto, talvez seja possível torna-las ainda melhores através da respetiva manipulação genética.

Em 2010 foi realizado um estudo no qual os autores modificaram geneticamente as OECs transferindo o gene *NT3* usando um vector retroviral.^[25] Estas células tornaram-se então produtoras de neurotrofina-3, um factor de crescimento neuronal conhecido pelos seus efeitos benéficos na protecção e crescimento neuronais. Os resultados mostraram que o transplante de OECs produtoras de NT-3 para o local de lesão medular em ratinhos, estimulou um maior aumento da regeneração neuronal, em comparação com as OECs normais.

Em 2017 foi realizado um estudo que consistiu na introdução de um gene que permite às OECs expressar prostaciclina.^[26] Esta molécula funciona como um vasodilatador primário e é um inibidor da adesão leucocitária e da agregação plaquetária. A prostaciclina é sintetizada através da acção sequencial da COX 1 ou 2 e da prostaciclina sintetase, da via do ácido araquidónico e é produzida após lesão ou inflamação tecidual. Existe evidência de que a prostaciclina e seus derivados poderão ter as seguintes funções:

- _Reduzem a lesão cortical em cérebros isquémicos ou com lesão traumática(em ratinhos);
- _São benéficos em culturas neuronais e em cérebros parkinsónicos;

_Facilitam a remodelação axonal contribuindo para o processo de regeneração em doentes com esclerose múltipla.

Tendo em conta estes achados, os autores do estudo foram levados a testar a possibilidade de que a prostaciclina contribua para a regeneração da medula espinhal em contexto de lesão. Para isto, transferiram o gene PTGIS (gene que codifica a enzima que produz a prostaciclina) para as OECs usando como vector o adenovírus, transplantando depois as células para ratinhos com lesões medulares. Os resultados do estudo mostraram que a síntese de prostaciclina em OECs transplantadas aumentou significativamente a recuperação funcional e a regeneração neuronal na medula espinhal de ratos em contexto de lesão. Estes estudos mostram que, apesar de as OECs terem um potencial enorme por si só, é possível modificá-las de modo a que se tornem ainda mais eficazes na promoção de regeneração neuronal. As possibilidades deste tipo de abordagem são inúmeras.

Discussão

Nesta revisão, foi explorado o papel das OECs na regeneração neuronal em contexto de lesões da medula espinhal. As OECs apresentam características funcionais e morfológicas que as tornam essenciais à regeneração neuronal no SNO, e essa capacidade regenerativa pode ser utilizada em contexto de lesão do SNC. Com base nestas bases teóricas fortes, foram realizados diversos estudos em modelos animais e em humanos, que confirmaram essa hipótese, mostrando um grau significativo de recuperação funcional em grande parte indivíduos submetidos ao transplante de OECs. No entanto, há ainda desafios a superar e metas a atingir:

Ainda não é claro qual a fonte ideal das OECs: mucosa nasal ou bulbo olfativo. Embora se saiba que ambas têm propriedades pro-regenerativas, existe um grande debate sobre qual será o tipo celular ideal para usar em contexto de transplante. Curiosamente, existe pelo menos um estudo que mostra benefício no transplante simultâneo de ambos os tipos celulares. Definir a melhor estratégia é essencial, para que se possam uniformizar os estudos e ensaios clínicos a realizar no futuro.

Outro desafio é o facto de que os estudos realizados até à data não nos permitem com toda a certeza definir se o transplante de OECs é suficiente para provocar recuperação funcional, ou se deverá ser realizado em conjunto com outras células (nomeadamente fibroblastos ou *stem-like cells*), ou complementado por outras

terapêuticas, como a excisão da cicatriz glial, o enxerto de fibras nervosas no local de lesão, e a reabilitação após a cirurgia. É também necessário definir o papel da manipulação genética das OECs de forma a aumentar o seu potencial regenerativo, visto haver evidência de que possa ser benéfica.

Por outro lado, poderá ser útil a revisão do modo de avaliar a recuperação funcional dos doentes nestes ensaios clínicos. O score ASIA, apesar de útil, apresenta algumas limitações, nomeadamente o facto de ignorar a melhoria progressiva do indivíduo até que este atinja um determinado patamar funcional.

A mutação genética de OECs permite a indução da expressão de, virtualmente, qualquer molécula. Cabe à comunidade científica inovar e encontrar formas de usar essa estratégia de modo a otimizar o potencial regenerativo das OECs.

Por último, são necessários ensaios clínicos com um maior número de doentes, nomeadamente estudos de fase 3, para que, caso se continue a verificar o padrão de recuperação funcional atingido em estudos anteriores, se possa sugerir esta terapêutica para a generalidade da população com lesões traumáticas da medula espinhal, mudando para sempre o paradigma do tratamento destas lesões.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que me apoiaram ao longo da realização deste trabalho, e dos longos anos de curso que estão a atingir o seu término.

Em primeiro lugar à minha família, com especial menção aos meus pais e irmãos, pelo apoio total e incessante, sem o qual seria impossível atingir os objetivos a que me propus.

Aos colegas e amigos que trabalharam a meu lado quando necessário, e proporcionaram momentos inesquecíveis ao longo deste percurso.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa por ter proporcionado a minha formação médica

Ao Dr. Marco Simão, por se ter disponibilizado a orientar a realização deste trabalho.

Ao professor Óscar Dias pelo seu dinamismo, disponibilidade, e interesse na formação médica e divulgação do conhecimento científico na área da otorrinolaringologia.

Bibliografia

1. Anna, Z., Katarzyna, J.-W., Joanna, C., Barczewska, M., Joanna, W. and Wojciech, M. Therapeutic Potential of Olfactory Ensheathing Cells and Mesenchymal Stem Cells in Spinal Cord Injuries. 10.1155/2017/3978595.
2. Richter, M.W. and Roskams, A.J. (2008) Olfactory ensheathing cell transplantation following spinal cord injury: Hype or hope? *Experimental Neurology*, 2008: 10.1016/j.expneurol.2007.06.011.
3. Oyinbo, C.A. (2011) Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, **71**, 281–299.
4. Thuret, S., Moon, L.D.F. and Gage, F.H. (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, **7**, 628–643.
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn1955>.
5. Tabakow, P. and Raisman, G. (2014) Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. *Cell Transplantation*, **23**, 1–70.
6. Ekberg, J.A.K. and St John, J.A. (2014) Crucial roles for olfactory ensheathing cells and olfactory mucosal cells in the repair of damaged neural tracts. *Anatomical Record*, 2014: 10.1002/ar.22803.
7. Khankan, R.R., Griffis, K.G., Haggerty-Skeans, J.R., Zhong, H., Roy, R.R., Edgerton, V.R., et al. (2016) Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 2016: 10.1523/JNEUROSCI.0085-16.2016.
8. Jerry Silver, Martin E. Schwab, and P.G.P. (2015) Central Nervous System

Regenerative Failure : *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **7**, a020602.

9. Muramatsu, R., Ueno, M. and Yamashita, T. (2009) Intrinsic regenerative mechanisms of central nervous system neurons. *BioScience Trends*, **3**, 179–183.
10. Chou, R.-H., Lu, C.-Y., Wei-Lee, Fan, J.-R., Yu, Y.-L. and Shyu, W.-C. (2014) The Potential Therapeutic Applications of Olfactory Ensheathing Cells in Regenerative Medicine. *Cell Transplantation*, 2014: 10.3727/096368914X678508.
11. Doucette, R. (1993) Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech*, **24**, 113–130.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8457724.
12. Guérout, N., Paviot, A., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Genty, D., Jean, L., et al. (2011) Co-transplantation of olfactory ensheathing cells from mucosa and bulb origin enhances functional recovery after peripheral nerve lesion. *PLoS ONE*, **6**.
13. Richter, M.W. (2005) Lamina Propria and Olfactory Bulb Ensheathing Cells Exhibit Differential Integration and Migration and Promote Differential Axon Sprouting in the Lesioned Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, **25**, 10700–10711.
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3632-05.2005>.
14. Gómez, R.M., Sánchez, M.Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G.E., Sierra, J., et al. (2018) Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, 2018: 10.1002/glia.23282.
15. Yang, H., He, B.R. and Hao, D.J. (2014) Biological Roles of Olfactory Ensheathing Cells in Facilitating Neural Regeneration: A Systematic Review. *Molecular Neurobiology*, 2014: 10.1007/s12035-014-8664-2.
16. Guérout, N., Derambure, C., Drouot, L., Bon-Mardion, N., Duclos, C., Boyer, O., et al. (2010) Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia*, **58**, 1570–1580.
17. López-Vales, R., García-Alías, G., Forés, J., Vela, J.M., Navarro, X. and Verdú, E. (2004) Transplanted olfactory ensheathing cells modulate the inflammatory response in the injured spinal cord. *Neuron glia biology*, **1**, 201–209.
18. Ramón-Cueto, A., Cordero, M.I., Santos-Benito, F.F. and Avila, J. (2000)

Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron*, **25**, 425–435.

19. DeLucia, T.A., Connors, J.J., Brown, T.J., Cronin, C.M., Khan, T. and Jones, K.J. (2003) Use of a cell line to investigate olfactory ensheathing cell-enhanced axonal regeneration. *The Anatomical Record*, **271B**, 61–70.
<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.b.10014>.
20. Ibrahim, A.G., Kirkwood, P.A., Raisman, G. and Li, Y. (2009) Restoration of hand function in a rat model of repair of brachial plexus injury. *Brain*, **132**, 1268–1276.
21. Su, Z., Yuan, Y., Chen, J., Cao, L., Zhu, Y., Gao, L., et al. (2009) Reactive astrocytes in glial scar attract olfactory ensheathing cells migration by secreted TNF- α in spinal cord Lesion Of Rat. *PLoS ONE*, **4**.
22. Lima, C., Pratas-Vital, J., Escada, P., Hasse-Ferreira, A., Capucho, C. and Peduzzi, J.D. (2006) Olfactory Mucosa Autografts in Human Spinal Cord Injury: A Pilot Clinical Study. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 2006:
10.1080/10790268.2006.11753874.
23. Lima, C., Escada, P., Pratas-Vital, J., Branco, C., Arcangeli, C.A., Lazzeri, G., et al. (2010) Olfactory Mucosal Autografts and Rehabilitation for Chronic Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 2010:
10.1177/1545968309347685.
24. Tabakow, P., Jarmundowicz, W., Czapiiga, B., Fortuna, W., Miedzybrodzki, R., Czyz, M., et al. (2013) Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplantation*, **22**, 1591–1612.
25. Ma, Y.-H., Zhang, Y., Cao, L., Su, J.-C., Wang, Z.-W., Xu, A.-B., et al. (2010) Effect of Neurotrophin-3 Genetically Modified Olfactory Ensheathing Cells Transplantation on Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, 2010:
10.3727/096368910X492634.
26. Tsai, M.J., Huang, C.T., Huang, Y.S., Weng, C.F., Shyue, S.K., Huang, M.C., et al. (2017) Improving the regenerative potential of olfactory ensheathing cells by overexpressing prostacyclin synthetase and its application in spinal cord repair. *Journal of Biomedical Science*, 2017: 10.1186/s12929-017-0340-1.

