

LA MUCOSA OLFATORIA: UNA FUENTE PERMANENTE DE NEURONAS

EUGENIA SACERDOTE de LUSTIG¹, ALEJANDRO D. JOSIOWICZ^{1, 2}

¹ Departamento de Investigaciones del Instituto de Oncología Angel H. Roffo; ² Servicio de Microscopía Electrónica, Departamento de Virología, INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

Resumen Los resultados experimentales sobre trasplantes de células nerviosas embrionarias en el sistema nervioso central nos indican que estas células precursoras podrían ser utilizadas para sustituir células dañadas en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo el uso de células provenientes de embriones humanos es todavía controvertido. Se necesitan fuentes alternativas, éticamente aceptables que permitan superar los problemas inherentes al uso de este tipo de tejido. Varias fuentes han sido propuestas como las células de la médula ósea, células del bulbo olfatorio y astrocitos. Aquí sugerimos la utilización de la célula precursora neuronal de la mucosa olfatoria, con características de células pluripotentes, para la terapia de reemplazo celular.

Palabras claves: células pluripotentes humanas, mucosa olfatoria

Abstract *Olfactory mucosa: a continuous source of neurons.* Experimental transplantation of embryonic nervous cells in the central nervous system demonstrates that these precursor cells can be used to repair damaged cells in neurodegenerative diseases. However, the use of cells from embryos is still controversial and alternative ethically accepted sources are needed to overcome the inherent problems. Several sources have been proposed such as bone marrow cells, olfactory bulb cells and astrocytes. We suggest the use of neuronal precursor cells from the nasal olfactory mucosa as an alternative source for transplantation therapy, since these peripheral cells exhibit stem cell characteristics.

Key words: human adult stem cells, olfactory mucosa

Es bien conocido que muchos tejidos como piel, intestino y médula ósea tienen la capacidad de renovarse continuamente y en particular luego de una lesión. A diferencia de estos tejidos, no se conocía hasta recientemente, que las células nerviosas tuvieran esta capacidad. El descubrimiento de la neurogénesis en cerebro adulto ha terminado con el dogma que sostenía la incapacidad de la neurona de regenerarse en la vida adulta. A partir de 1998, con el descubrimiento de Eriksson et al.¹, quienes demostraron la generación de nuevas neuronas en cerebro de humano adulto se abrió la posibilidad de utilizar estas células capaces de multiplicarse para reemplazar tejido nervioso degenerado.

Estas células con capacidad mitótica presentan características de células totipotentes², es decir, células de tipo indiferenciadas capaces de renovarse y diferenciarse en todos los tipos de células de un tejido^{3, 4}. Se conocen principalmente dos localizaciones específicas para las células pluripotentes neuronales en el cerebro

de mamífero adulto: la zona subgranular de la fascia dentada en el hipocampo y la zona subventricular del cerebro anterior que genera neuronas que migran al bulbo olfatorio^{5, 6}.

Estas células pluripotentes son sensibles a varios estímulos. Por ejemplo, *in vitro*, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) induce a estas células precursoras a diferenciarse en neuronas⁷. Si se tratan con la hormona triiodotironina (T3) las células se diferencian en glía⁸, mientras que el factor de crecimiento ciliar las induce a diferenciarse en astrocitos⁹.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (b-FGF) permiten la expansión *in-vitro* de las células pluripotentes. Si posteriormente a la expansión, estas células son trasplantadas en cerebro adulto darán origen a neuronas maduras².

In vivo estos mismos factores (EGF y b-FGF) estimulan la multiplicación de las células pluripotentes¹⁰. Otros factores como el estrés y la cortisona, en cambio, son inhibitorios de su crecimiento.

Podemos agregar que con el descubrimiento de las células pluripotentes del sistema nervioso central se abre la posibilidad de elevar el número y diferenciación de estas células totipotentes en elementos nerviosos espe-

Recibido: 12-III-2001

Aceptado: 6-VII-2001

Dirección postal: Dra. Eugenia Sacerdote de Lustig, Departamento de Investigaciones, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Avda. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires
Fax: (54-11) 4580-2811 e-mail: invroffo@fmed.uba.ar

cíficos por medio de estimulación farmacológica o por medio de factores de crecimiento. Sin embargo, hasta ahora, no hay evidencia que estas células pluripotentes permanezcan en el sistema nervioso central en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Es por eso que el trasplante neuronal es una alternativa de sumo interés.

Son muchos los trabajos experimentales que demuestran que las células nerviosas embrionarias implantadas en el sistema nervioso central de animales, tienen la capacidad de sobrevivir, diferenciarse e integrarse en el cerebro hospedador. También se demostró que las células implantadas atenúan las alteraciones cognitivas y motoras en estos animales lesionados. A partir de estos resultados el trasplante neuronal adquiere nueva dimensión terapéutica.

Hasta ahora, se ha propuesto y utilizado principalmente tejido embrionario, proveniente de fetos humanos y en otros casos tejido proveniente de animales como el cerdo¹¹. Pero dichas fuentes de embriones presentan discutidos problemas éticos. La escasez de tejido embrionario a disposición, la estandarización del tejido y el rechazo son otras limitaciones para el desarrollo de la terapia de trasplante neuronal.

Las dificultades señaladas limitan el progreso rápido del trasplante de tejido nervioso humano, a pesar que ya se ha utilizado el tejido embrionario en enfermos de Parkinson¹². Estas limitaciones podrían ser superadas por la utilización de una fuente accesible, inmunológicamente compatible y éticamente aceptable.

Una fuente posible de origen extra nervioso son las células de médula ósea que pueden diferenciarse en varios tipos de células, aún nerviosas, y que inyectadas por vía sanguínea o peritoneal llegan al cerebro donde expresan antígenos neuronales¹². Recientemente se demostró *in vitro*¹³ que los astrocitos de la zona subependimial de ratones adultos conservan su capacidad multipotencial en presencia de factores de crecimiento específicos.

Otra fuente más específica de células pluripotentes, es la del bulbo olfatorio. Estas células fueron obtenidas y cultivadas de pacientes adultos luego de intervenciones quirúrgicas y se ha propuesto utilizar esta fuente de células pluripotentes para trasplantes en enfermedades neurodegenerativas¹⁴.

Consideramos que otra fuente, podría ser la célula pluripotente neuronal de la mucosa olfatoria, con las ventajas de su muy fácil acceso y con la posibilidad de utilizarla en autotrasplantes y que además se diferencia respecto de la médula ósea, al originar normalmente neuronas.

Estas células totipotentes en la mucosa olfatoria, las cuales mantienen neurogénesis continua durante toda la vida^{15,16}, significan una fuente permanente de neuronas inmaduras que podrían, en un futuro, ser aptas para la

terapia de reemplazo celular en enfermedades neurodegenerativas.

La mucosa olfatoria es una región especializada de la cavidad nasal. Histológicamente (Fig. 1) se presenta como un epitelio cilíndrico pseudoestratificado que contiene diferentes tipos de células, entre ellos, la neurona sensorial en diferentes estados de diferenciación, la célula basal y la célula sustentacular (esta última con características de célula glial). Los cuerpos celulares de las neuronas maduras se encuentran en diferentes niveles en la capa epitelial y proyectan sus axones directamente al sistema nervioso central, haciendo sinapsis con las células del bulbo olfatorio. Las neuronas olfatorias maduras expresan la proteína marcadora olfatoria (OMP) que permite su identificación en el epitelio olfatorio¹⁷. Tanto las neuronas olfatorias maduras como las inmaduras expresan β -tubulina específica de neurona y la molécula de adhesión neuronal (NCAM)¹⁸. En el epitelio, las células basales se encuentran en continua división y su progenie originaría las neuronas dentro de la cavidad nasal. Estas células que se dividen continuamente son consideradas células pluripotentes.

Las células pluripotentes se dividen asimétricamente originando otra célula pluripotente y una célula precursora neuronal. Mientras que la célula pluripotente permanece cerca de la membrana basal, la célula precursora se divide varias veces y da origen a muchas neuronas inmaduras que migran de la membrana basal a medida que se diferencian¹⁹. La maduración final ocurre cuando el axón de la neurona olfatoria hace sinapsis en el bulbo

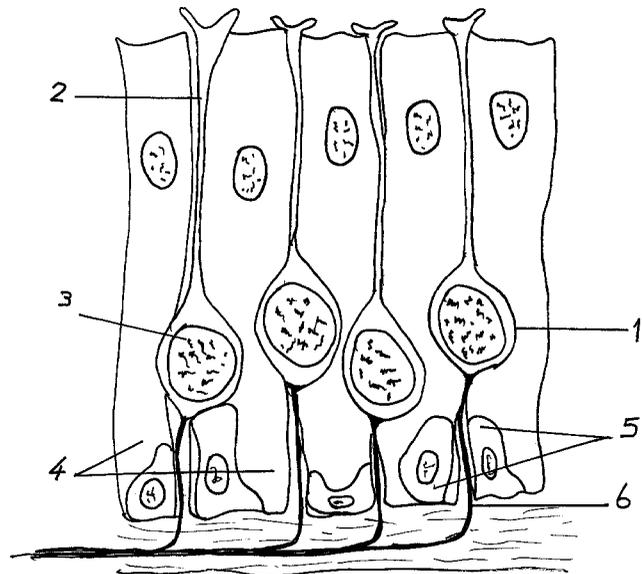


Fig. 1.- Esquema de la mucosa olfatoria. 1, neurona olfatoria; 2, dendrita de la neurona olfatoria; 3, núcleo de la neurona olfatoria; 4 células sustentaculares; 5, células basales; 6, axón de la neurona olfatoria.

olfatorio y sus dendritas alcanzan la superficie de la mucosa olfatoria.

En la población de células basales se han identificado dos tipos de células, las células basales globosas y las células basales horizontales. Estas células pueden distinguirse inmunohistoquímicamente por la presencia de citoqueratina en las células basales horizontales y ausencia en las globosas. Además las células basales globosas son las únicas que expresan la proteína marcadora de la célula basal (GBC1)²⁰. Si bien muchos estudios indican que la célula que origina a la neurona olfatoria se encuentra en la población de las células basales, aún está en discusión si es la célula basal globosa o la célula basal horizontal la célula precursora de la neurona olfatoria.

Experimentalmente, la neurogénesis en la mucosa olfatoria puede ser estimulada al degenerarse masivamente la neurona olfatoria, esto se logra cortando el nervio olfatorio o removiendo el bulbo olfatorio. De esta manera, se produce un incremento exponencial en la mitosis de las células basales seguido por la restitución de las neuronas sensoriales. Así mismo, se puede provocar un efecto similar con una lesión química (sulfato de zinc y bromuro de metilo). Parece ser que el epitelio olfatorio se encuentra en un equilibrio dinámico entre la multiplicación de las células basales, la diferenciación y la apoptosis neuronal^{21, 22}.

Son muchos los factores que estimularían la neurogénesis en sistema nervioso adulto. En la mucosa olfatoria los factores actúan de manera secuencial según el estado de diferenciación y localización de la célula en la mucosa. Además, los factores pueden actuar de manera autócrina o parácrina como es el caso del b-FGF. Estos efectos fueron demostrados por Ensolì et al.²³ cuando observaron en un cultivo de la mucosa olfatoria la liberación del b-FGF y además este mismo factor agregado al medio de cultivo estimula la proliferación de las células cultivadas. Por lo tanto, este factor tiene acción sobre las células totipotentes del sistema nervioso central como así también sobre las células precursoras de la neurona olfatoria, estimulando *in vitro*, la proliferación de las células basales globosas²⁴. Otros factores de acción conocida son el EGF y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) que estimulan la proliferación de las células basales horizontales en cultivo de epitelio olfatorio embrionario²⁵.

El TGF- β 2 induce a las células basales globosas a expresar marcadores neuronales como es el N-CAM, iniciando la diferenciación a neurona²⁶.

Cuando la neurona olfatoria desarrolla su dendrita alcanzando el lumen de la cavidad nasal, toma contacto con el mucus que contiene dopamina y factor de crecimiento insulínico (IGF). Ambos factores tienen acciones sobre la neurona olfatoria. La dopamina promueve la

diferenciación de la neurona olfatoria²⁷, y el IGF incrementa el número de células proliferantes en el epitelio²⁸.

Valdría la pena probar la acción de las células olfatorias en un modelo transgénico recientemente desarrollado en ratones, con déficit en el sistema colinérgico y el comportamiento²⁹, que presentan características histopatológicas muy parecidas a la enfermedad de Alzheimer.

La célula olfatoria capaz de multiplicarse también podría ser de utilidad para sustituir zonas dañadas de otros tejidos como la retina, donde Nishida et al.³⁰ ya lo han intentado con células pluripotentes del hipocampo.

Cabe destacar, que ya se ha utilizado a la mucosa olfatoria como fuente de células gliales para reparar lesiones de la médula espinal³¹.

Bibliografía

1. Eriksson E, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-7.
2. Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cell transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11879-83.
3. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz, et al. Generalized potential of adult stem cell. *Science* 2000; 288: 1660-3.
4. Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 1996; 383: 624-7.
5. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994; 13: 1071-82.
6. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolates of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-10.
7. Williams BP, Park JK, Alberta JA, et al. A PDGF-regulated immediate early gene response initiates neuronal differentiation in ventricular zone progenitor cells. *Neuron* 1997; 18: 553-62.
8. Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, et al. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 1997; 287: 477-83.
9. Rajan P, MacKay ED. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 1998; 18: 3620-29.
10. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997; 17: 5820-8.
11. Josiowicz AD, Sacerdote de Lustig E. Transplante de células nerviosas en enfermedades neurodegenerativas. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 521-4.
12. Mezey E, Chandross KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 297-302.
13. ED Laywell, P Rakic, VG Kukekov, EC Holland, DA Steinder. Identification of a multipotent astrocyt stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sc USA* 2000; 97: 13883-8.
14. Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cell* 2000; 18: 295-300.

15. Calof AL, Mumm JS, Rim PC, Shou J. The neuronal stem cell of the olfactory epithelium. *J Neurobiol* 1998; 36: 190-205.
16. Murrel W, Bushell GR, Livesey J, et al. Neurogenesis in adult human. *Neuroreport* 1996; 7: 1189-94.
17. Margolis FL. Olfactory marker protein: from PAGE band to cDNA clone. *Trends Neurosci* 1985; 8: 542-6.
18. Calof AL, Chikaraishi DM. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor in vitro. *Neuron* 1989; 3: 115-27
19. Mackay-Sim A, Kittel P. Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: a quantitative autoradiographic study. *J Neurosci* 1991; 11: 979-84.
20. Goldstein BJ, Schwob JE. Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J Neurosci* 1996; 16: 4005-16.
21. Holcomb J, Mumm JS, Calof AL. Apoptosis in the neuronal lineage of the mouse olfactory epithelium: regulation in vivo and in vitro. *Dev Biol* 1995; 172: 307-23.
22. Michel D, Moysse E, Brun G, Jourdan F. Induction of apoptosis in rat olfactory neuroepithelium by synaptic target ablation. *Neuroreport* 1994; 5: 1329-32.
23. Ensoli F, Fiorelli V, Vannelli B, et al. Basic fibroblast growth factor supports human olfactory neurogenesis by autocrine/paracrine mechanisms. *Neuroscience* 1998; 86: 881-93.
24. Newman M, Feron F, Mackay-Sim A. Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience* 2000; 99: 343-50.
25. Farbman A, Buchholz JA. Transforming growth factor- α and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium in vitro. *J Neurobiol* 1996; 30: 267-80.
26. Satoh M, Takeuchi M. Induction of NCAM expression in mouse olfactory keratin-positive basal cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 1995; 87: 111-9.
27. Feron F, Vincent A, Mackay-Sim A. Dopamine promotes differentiation of olfactory neuron in vitro. *Brain Res* 1999; 845: 252-9.
28. Pixley S, Dangoria N, Odoms K, Hastings L. Effects of insulin-like growth factor 1 on olfactory neurogenesis in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 855: 244-7.
29. Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6826-31.
30. Nishida A, Takahashi M, Tanihara H et al. Incorporation and Differentiation of Hippocampus-Derived Neural Stem cells Transplanted in Injured Adult Rat Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 4268-74.
31. Lu J, Feron F, Ho SM, Mackay-Sim A, Waite PM. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain Res* 2001; 889: 344-57.

We know, however, that in a social species not only the individual must be considered –an entire social group can be the target of selection. Darwin applied this reasoning to the human species in 1871 in The Descent of Man. The survival and prosperity of a social group depends to a large extent on the harmonious cooperation of the members of the group, and this behavior must be based on altruism. Such altruism, by furthering the survival and prosperity of the group, also indirectly benefits the fitness of the group's individuals. The result amounts to selection favoring altruistic behavior.

Nosotros sabemos, sin embargo, que en las especies sociales no sólo el individuo debe ser considerado –un grupo entero puede ser el blanco de selección. Darwin aplicó este razonamiento a la especie humana en 1871, en *La descendencia del hombre*. La supervivencia y prosperidad de un grupo social depende, en gran medida, en la armoniosa cooperación de los miembros del grupo, y esta conducta debe estar basada en el altruismo. Tal altruismo, al favorecer la supervivencia y prosperidad del grupo, indirectamente también beneficia las aptitudes de los individuos del grupo. El resultado significa una selección que favorece la conducta altruista.

Ernst Mayr

Darwin's Influence on Modern Thought. Scientific American 2000; 283: 67-71.
(Artículo basado en la conferencia dada por el autor en Estocolmo, en setiembre de 1999, en ocasión de recibir al Premio Crafoord de la Real Academia de Ciencias de Suecia)