



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto del trasplante autólogo de células de la glia envolvente olfatoria en casos clínicos de lesión medular en caninos

Juan Martin Otálora Otálora

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Neurociencias
Bogotá, D.C.
2021**

Efecto del trasplante autólogo de células de la glia envolvente olfatoria en casos clínicos de lesión medular en caninos

Juan Martin Otálora Otálora

**Tesis presentada como requisito para optar el título de:
Magister en Neurociencias**

**Directora:
Dra Lucía Botero Espinosa**

**Codirector:
Dr. Kemel Ghotme G.**

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Neurociencias
Bogotá, D.C.
2021**

A la memoria de mis abuelos Mercedes y Nicanor cuyo recuerdo amoroso todavía acaricia con suave ternura los intrincados paisajes neuronales de mi ser.

A los pacientes que me han permitido adentrarme en el apasionante mundo de las neurociencias, ellos quienes han sido son y serán la razón de ser de mi ser.

A mi amado hijo a quien hablo con el ejemplo, perseverar, perseverar, perseverar.

Agradecimientos

A la Doctora Lucía Botero Espinosa directora de la tesis quien gentilmente aceptó acompañarme en esta inolvidable experiencia y me brindó la oportunidad de realizar la investigación del trasplante celular en pacientes caninos. Gracias al concurso de sus conocimientos, a su calidad humana y a su apoyo constante logré terminar de manera satisfactoria mis estudios y mi tesis de maestría.

Al Doctor Kemel Ghotme neurocirujano, codirector del trabajo de investigación, por su colaboración en el análisis e interpretación de las imágenes de resonancia magnética, por su valiosa orientación y guía en el proceso de la realización de los trasplantes, dándome confianza y tranquilidad en momentos tan emocionantes e inolvidables en el quirófano.

A la Maestría en Neurociencias de la Facultad de Medicina y a sus docentes por el tiempo y dedicación en los seminarios que me permitieron acceder a la complejidad y belleza de esta maravillosa rama del conocimiento.

Al laboratorio de equipos comunes de la Facultad de Medicina donde logré llevar a cabo el proceso de cultivos celulares.

Al doctor Vladimir Galindo director de la Clínica para pequeños animales por permitirme utilizar las instalaciones para las evaluaciones neurológicas y el quirófano donde se realizaron los trasplantes.

Al Doctor Henry Meneses por su amable y valiosa colaboración en los procesos de imagenología y trasplante.

A las y los estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria quienes de manera gentil se emplearon a fondo en los procesos de recepción, preparación, cuidado y entrega de los pacientes. Fue muy agradable observar su entusiasmo y recibir el apoyo de todos ellos.

Al profesor de estadística José Otálora mi padre, por su apoyo, orientación y valiosa colaboración en el análisis estadístico del presente trabajo de investigación.

A la fisioterapeuta Karen Andrea Alonso por sus aportes y participación en el análisis de la marcha mediante la escala Olby, por su tiempo, paciencia y conocimientos.

Al personal del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia dónde gentilmente se realizaron los análisis microbiológicos de las muestras de los cultivos.

Al biólogo Diego Andrés Prada del laboratorio de Patología veterinaria quien amablemente realizó las pruebas PCR para micoplasma de las muestras de los cultivos por su amabilidad y participación en la logística de los materiales esterilizados para la realización de los cultivos celulares.

A mis nobles peludos compañeros de viaje Hanny y Tomy de quienes casi voluntariamente obtuve muestras de mucosa y logré por fin estandarizar los cultivos.

A mi querida Universidad Nacional por brindarme la oportunidad y el orgullo de pasar por segunda ocasión como estudiante de esta institución y por financiar esta investigación por medio de la dirección de investigación de Bogotá.

Al Centro de Resonancia especializada veterinaria CREVET, a sus directivos, administración, anesthesiólogos veterinarios, personal auxiliar y de aseo por su gran colaboración y por permitirme realizar la toma de la muestra en sus instalaciones.

A los acudientes de los pacientes por su comprensión, paciencia y colaboración, tantas citas, tantas veces, realmente destinar tanto tiempo en el traslado de los caninos durante todo el proceso fue algo agotador, incluso en plena pandemia con restricciones a la movilidad y confinamiento.

A los pacientes quienes fueron realmente pacientes durante tanto tiempo invertido y sometidos bajo anestesia general en dos ocasiones, ellos fueron utilizados sin saberlo en esta investigación, pero seguramente sintieron el buen trato al que fueron sometidos, todo por una noble causa, para ellos mi cariño y respeto eternos.

Y a todos aquellos que hicieron posible esta investigación.

Finalmente y no por eso menos importante, a mi Dios que todo lo puede.

Efecto del trasplante autólogo de células de la glia envolvente olfatoria en casos clínicos de lesión medular en caninos

Resumen

La lesión medular es un infortunado evento que generalmente implica un padecimiento que a corto, mediano y largo plazo tiene múltiples implicaciones no solo para quien la padece sino además para su núcleo familiar y la sociedad en general (DeVivo and Chen, 2011; Angeli et al., 2018). Para su tratamiento con terapia celular se han utilizado variedad de células entre las que se destacan el trasplante de células de la glia envolvente olfatoria (CGEO). Específicamente en caninos se han utilizado CGEO del bulbo olfatorio y de la mucosa olfatoria, obtenidas mediante procedimientos quirúrgicos medianamente invasivos. En esta investigación innovamos en la toma de la muestra por vía endoscópica en la cavidad nasal evitando el abordaje quirúrgico del seno nasal e innovamos también al realizar el trasplante con una técnica percutánea con guía ecográfica para la introducción de la aguja y el depósito de las células a nivel intramedular sin necesidad de realizar un procedimiento quirúrgico invasivo que implicara laminectomía y mielotomía. Utilizamos imágenes de resonancia magnética para identificar el sitio exacto de la lesión para realizar el trasplante. Medimos el efecto del trasplante de CGEO no purificadas (conteniendo en promedio un 45% de CGEO) en una muestra de 8 perros de compañía que presentaron lesión medular traumática crónica en la ciudad de Bogotá. Se realizaron pruebas neurológicas y evaluación de la marcha utilizando la escala Olby en pre-trasplante y mensuales pos-trasplante por tres meses encontrando cambios significativos en algunas de las variables analizadas. Por lo que pudimos concluir que el efecto del trasplante de CGEO en casos clínicos de lesión medular en caninos es seguro y trajo efectos benéficos en algunos de los pacientes. Es de aclarar que no se presentaron recuperaciones en las pruebas de propiocepción general ni en reacciones posturales por lo que pensamos que las mejoras observadas

se debieron posiblemente a cambios locales en circuitos medulares y no a una recuperación del movimiento que depende de tractos largos tanto ascendentes como descendentes.

Palabras claves:

Lesión medular

Trasplante autólogo

Células de la glia envolvente olfatoria

Effect of autologous olfactory ensheathing glial cell transplantation in clinical cases of spinal cord injury in canines

Abstract

Spinal cord injury is an unfortunate event that generally involves a condition that in the short, medium and long term has multiple implications not only for the person suffering from it but also for their family nucleus and society in general (DeVivo and Chen, 2011; Angeli et al., 2018). For its treatment with cell therapy, a variety of cells have been used, among which the transplantation of ensheathing glial cells (CGEO). Specifically in canines, CGEO of the olfactory bulb and olfactory mucosa have been used, obtained through moderately invasive surgical procedures. In this research we innovate in taking the sample endoscopically in the nasal cavity avoiding the surgical approach to the nasal sinus and we also innovate by performing the transplant with a percutaneous technique with ultrasound guidance for the introduction of the needle and the deposit of cells intramedullary level without the need for an invasive surgical procedure involving laminectomy or myelotomy. We use magnetic resonance imaging to identify the exact site of the injury to perform the transplant. We measured the effect of non-purified CGEO transplantation (containing an average of 45% CGEO) in a sample of 8 companion dogs that presented chronic traumatic spinal cord injury in the city of Bogotá. Neurological tests and gait evaluation were performed using the Olby scale in pre-transplantation and monthly post-transplantation for three months, finding significant changes in some of the variables analyzed. Therefore, we were able to conclude that the effect of CGEO transplantation in clinical cases of spinal cord injury in canines is safe and brought beneficial effects in some of the patients. It is worth clarifying that there were no recoveries in the general proprioception tests or in postural reactions, so we think that the observed improvements were possibly due to local changes in spinal circuits and not to a recovery of movement that depends on long ascending and long tracts descending.

Key words:

Spinal cord

Autologous trasplant

Ensheathing glial cells

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras	XVII
Lista de tablas	XIX
Lista de Símbolos y abreviaturas	XX
Introducción	1
Objetivos	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
1. Revisión de literatura	5
1.1 Lesión medular	5
1.1.1. Fases fisiopatológicas de la lesión medular.....	6
1.1.2. Lesión medular primaria	6
1.1.3 Lesión medular secundaria.....	8
1.1.4 Mecanismos principales del daño secundario.....	10
1.1.5 Características de lesión medular en caninos.....	20
1.2 Células de la glía envolvente olfatoria	21
1.2.1 Generalidades	21
1.2.2 Origen de CGEO	24
1.3 Modelos in vivo de lesión medular, regeneración, remielinización, recuperación funcional	25
1.4 Potencial regenerativo de las CGEO.....	27
1.5 Estudios clínicos en humanos y caninos.....	33
2. Materiales y métodos	37
2.1 Búsqueda y clasificación de sujetos (animales experimentales)	37
2.1.1 Criterios de Inclusión	37
2.2 Toma de muestra de mucosa nasal para cultivo celular primario	38
2.2.1 Toma de la muestra de mucosa nasal.....	38
2.2.2 Cultivo primario de células de la glía envolvente olfatoria (CGEO)	41

2.3 Toma de resonancia magnética de columna vertebral.....	43
2.4 Prueba piloto para la introducción y ubicación de agujas espinales para trasplante.....	44
2.5 Intervención para procedimiento de trasplante medular de cultivo primario de CGEO.....	45
2.6 Evaluación funcional.....	47
2.6.1 Examen neurológico	47
2.6.2 Pruebas de sensibilidad somática general	50
2.6.3 Reflejos espinales.....	50
2.6.4 Otros reflejos.....	52
2.6.5 Evaluación de la marcha (registros en video).....	53
2.7 Análisis estadístico	53
2.8 Consideraciones éticas.....	54
3. Resultados	55
3.1 Selección de los animales experimentales.....	55
3.2 Cultivo de las células de la glia envolvente olfatoria	56
3.3 Evaluación de los pacientes	59
3.3.1 Seguridad de la técnica para la toma de la muestra.....	59
3.3.2 Seguridad del procedimiento de trasplante	60
3.3.3 Evaluación del efecto del trasplante en la respuesta al examen neurológico y evaluación de la marcha	60
3.3.4 Evaluación por imagenología de resonancia magnética (RM).....	70
4. Discusión.....	81
4.1 Toma de muestra y cultivo de CGEO	81
4.2 Técnica de trasplante	84
4.3 Evaluación funcional.....	85
4.4 Resonancias magnéticas.....	89
5. Conclusiones y recomendaciones	91
5.1 Conclusiones.....	91
5.2 Recomendaciones.....	92
Anexo 1: Consentimiento informado.....	95
Anexo 2: Registro Crevet	99
Anexo 3: Tablas resultados originales.....	99
Bibliografía.....	109

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Lesión primaria y daño secundario posteriores a una lesión traumática de la médula espinal.....	7
Figura 1-2. Tres fases fisiopatológicas después de la lesión medular.....	8
Figura 1-3. Evolución temporal de la infiltración de los diferentes tipos de células inmunes tras una lesión medular.	9
Figura 1-4. Representación de presencia de las CGEO en epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio principal.....	23
Figura 2-1. A) Endoscopio Karl Storz para aves utilizado en la endoscopia de la cavidad nasal de los caninos. B) Pinza para la toma de la muestra de mucosa nasal..	39
Figura 2-2. Distribución del epitelio respiratorio y epitelio olfatorio en la cavidad nasal canina (Craven et al.,2007).....	40
Figura 2-3. A) Mucosa olfatoria de color café. B) Mucosa respiratoria de color rosado.....	40
Figura 2-4. Embalaje de la muestra para procesamiento en el laboratorio de cultivos celulares.	41
Figura 2-5. Muestra de mucosa recepcionada en laboratorio de cultivos celulares.. ..	42
Figura 2-6. Resonador Esaote Vet MR grande. Posicionamiento del sujeto.....	43
Figura 2-7. RX Vista latero lateral de la pieza anatómica canina que permite observar la ubicación de las agujas espinales del piloto dentro de la médula espinal...	45
Figura 2-8. Preparación de los pacientes para el trasplante.....	47
Figura 3-1. Proceso selección de pacientes.....	55
Figura 3-2 Cultivo de CGEO. Paso 1.	57
Figura 3-3 Cultivo de CGEO. Paso 2.	57
Figura 3-4. Cultivo primario de CGEO. Paso 3.	58
Figura 3-5. Prueba de PCR para micoplasma.	59

Figura 3-6. Resultados de la evaluación de la marcha en la escala Olby.....	67
Figura 3-7. Paciente 1 pre-trasplante en A patrón de tijera por espasticidad, en B tercer mes pos-trasplante posición cuadrúpeda 4-6 seg.....	68
Figura 3-8. RM paciente 1.	74
Figura 3-9. RM paciente 2.	74
Figura 3-10. RM paciente 3.....	75
Figura 3-11. RM paciente 4.....	75
Figura 3-12. RM paciente 5.	76
Figura 3-13. RM paciente 6.....	76
Figura 3-14. RM paciente 7.....	77
Figura 3-15. RM paciente 8.	77
Figura 3-16. RM paciente 9.....	78

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1. Escala Olby para evaluación de miembros pélvicos en caninos.....	54
Tabla 3-1- Características de los pacientes seleccionados para el estudio	56
Tabla 3-2. Resultados individuales para las variables sensoriales.....	61
Tabla 3-3. Resultados pruebas neurológicas de sensibilidad, utilizando el test de los signos.....	62
Tabla 3-4. Resultados de reacciones posturales y propiocepción general utilizando el test de los signos.....	64
Tabla 3-5. Resultados de los reflejos utilizando el test de los signos.....	66
Tabla 3-6. Puntajes de la evaluación de la marcha en la escala de Olby en pretrasplante y postrasplante.	69
Tabla 3-7 Resultados evaluación de la marcha utilizando el test de los signos.....	70
Tabla 3-8. Hallazgos de resonancias realizadas en los sujetos.....	71
Tabla 3-9 Resume las conclusiones derivadas de la comparación de las imágenes de resonancia magnética pre y post de los pacientes sometidos al trasplante.....	79

Lista de abreviaturas

aCGEO	Células de glía envolvente olfatoria semejantes a astrocitos
ADN	Acido desoxiribonucleico
aFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
AMPA	Receptor para glutamato
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Astrocitos
ASIA	Asociación estadounidense de lesiones espinales
ATP	Adenosin Trifosfato
BBB	Basso, Bresnahan y Beattie
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BHE	Barrera Hemato Encefálica
BO	Bulbo olfatorio
BSME	Barrera sanguínea de la médula espinal
CBG	Células basales globosas
CBH	Células basales horizontales
CGEO	Células de la glía envolvente olfatoria
CMN	Células madre neuronales
CNMC	Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular
CPNasa	Marcador de células formadoras de mielina
CPOs	Células precursoras de oligodendrocitos
CREVET	Centro de resonancia especializada veterinaria
CS	Células de Schwann
CSPG	Condroitín sulfato proteoglicanos
CXCL	Quemoquina
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco modificado
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRG	Ganglio de la raíz dorsal

EGF	Factor de crecimiento epidermal
EO	Epitelio olfatorio
EM	Esclerosis múltiple
ErbB	Receptor para neuregulinas
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FAS	Proteína miembro de la familia del factor de necrosis tumoral
FB	Fast Blue
FGFa	Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
FGFb	Factor de crecimiento de fibroblasto básico
GAG	Glucosamino glicanos
GBA	Betaglucocerebrosidasa
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GFP	Proteína fluorescente verde
H2O2	Peróxido de hidrógeno
HDIE	Hernia discal intervertebral espontánea
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HNE	Hidroxinonenal
IGF	Factor de crecimiento parecido a la insulina
IL	Interleuquina
ILAR	International laboratory Animal Research
IL-R	Receptor de interleuquina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRM	Imagen de resonancia magnética
JAK/STAT	Janus –cinasa-transductor
LAR	antígeno común de leucocitos
LIF	Factor inhibitorio de la leucemia
LM	Lesión medular
LP	Lámina propia
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MAIs	Inhibidores asociados a mielina

MC	Medio de cultivo
ME	Médula espinal
MEC	Matriz extracelular
MME	Moléculas de matriz extracelular
MMP2	Metaloproteasa de matriz-2
MMP9	Metaloproteasa de matriz 9
MO	Mucosa olfatoria
MT	Medio de trasplante
3-NT	3-Nitrotisosina
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfatasa oxidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfatasa reductasa
NGF	Factor de crecimiento de nervios
NG2	Neuregulina-2
NMDA	Ácido-N-metil-D- aspártico
NPCs	Células progenitoras neurales
NPY	Neuropéptido Y
NT	Neurotrofinas
NTN	Neurturina
O-2	Superóxidos
OH	Radical hidroxilo
OL	Oligodendrocitos
OMgp	Glicoproteína mielina de oligodendrocitos
ON	Óxido nítrico
ONL	Capa de nervio olfatorio
ONOO-	Peroxinitritos
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
RIPK1	Receptor de proteín kinasa 1
RIPK3	Receptor de proteín kinasa 3
RL	Radicales libres
RPTPs	Proteína receptora de tirosina fosfatasa sigma
RX	Rayos x
SCARB2	Proteína scavenger clase B miembro 2

sCGEO	Células de glía envolvente olfatoria semejantes a schwann
Sem	Semaforina
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGFb3	Factor de crecimiento transformante b3
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa.
TNFa	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFTrks	Receptores de tirosin kinasa específicos
VEGF-A	Factor de crecimiento del endotelio vascular A

Introducción

La lesión de médula espinal (LM) es un evento destructivo que por lo general conlleva a un deterioro funcional significativo para quien la padece. Dicha lesión puede generar alteraciones en las funciones motora, sensitiva y/o autónoma con consecuencias psicosociales para la persona y su entorno familiar. Las causas de lesión medular son muy variadas incluyendo causas de origen congénito, traumático, infeccioso, tumoral o incluso secundario a enfermedades sistémicas (McKinley et al., 2001; DeVivo et al., 2006; DeVivo and Chen, 2011; Angeli et al., 2018). En los países desarrollados la lesión medular llega a cifras de 5,4 por 100.000 habitantes y en los demás entre 1 y 1,4 por cada 100.000, siendo los hombres los más afectados, con un promedio de edad alrededor de los 35 años, aunque también se ha especificado que más del 60% de los individuos afectados, son jóvenes menores de 25 años. También se ha definido que la lesión medular completa es más frecuente que la incompleta (Kattail et al., 2009). Aunque en las últimas décadas el porcentaje de supervivencia de la lesión traumática medular ha mejorado dramáticamente debido al progreso y perfeccionamiento de tratamiento de la lesión tanto en la fase aguda como en las fases posteriores con mejores técnicas de rehabilitación, todos estos cuidados siguen siendo paliativos y mejoran levemente las consecuencias de la parálisis, pero no consiguen mejorar verdaderamente la discapacidad y recuperar la función motora y sensitiva perdida con la lesión (Alizadeh et al., 2019). Actualmente el tratamiento de las lesiones medulares es todavía uno de los más grandes retos para los investigadores (Carlson and Gorden, 2002). Por esta razón desde la década de los noventa se vienen probando tratamientos alternativos para esta patología como el trasplante celular que buscan modificar el medio de la lesión, intervenir modulando los procesos del daño secundario, rellenar una cavidad y formar un puente entre el tejido preservado, reemplazar las zonas de necrosis y formar un ambiente que favorezca la regeneración axonal. En este sentido existe una amplia variedad de células que se ha usado para trasplante, basados especialmente en su potencial para promover y dirigir el crecimiento axonal, crear un puente regenerativo en el sitio de la lesión inducir la producción de mielina e inducir la regeneración de células neuronales o gliales. Entre

estas células se reportan algunas células madre como las neurales (CMN), las mesenquimales de cordón umbilical, y tejido adiposo y células diferenciadas como las células de la glía envolvente olfatoria (CGEO) (Ramon-Cueto et al., 2000; Oudega and Xu, 2006; Andrews and Stelzner, 2007; Guo et al., 2007; Ramon-Cueto and Munoz-Quiles, 2011) . Las CGEO son un tipo especial de glía que se localizan en el sistema nervioso periférico, en la mucosa olfatoria y en el sistema nervioso central, en las dos capas más externas del bulbo olfatorio. Diversos trabajos han mostrado su potencial para inducir regeneración axonal neuronal y disminución de la cicatriz glial en modelos animales, sin embargo, los ensayos en pacientes con lesión medular, han sido insuficientes (Akiyama et al., 2004; Andrews and Stelzner, 2004; Guest et al., 2006; Chehrehasa et al., 2010). En el caso de pacientes caninos apenas se han realizado muy pocos trabajos entre ellos Jeffery y cols., 2005 demostraron que el trasplante autólogo de CGEO provenientes del bulbo olfatorio es seguro y confiable en perros con lesión medular de ocurrencia natural (Jeffery et al., 2005). Granger y cols., 2012 en un estudio aleatorizado a doble ciego trasplantaron CGEO de cultivos de mucosa olfatoria del seno frontal y mucosa de cavidad nasal caudal con CGEO en perros con lesión medular crónica, demostrando mejora en la coordinación de miembros anteriores y posteriores en los perros trasplantados (Granger et al., 2012). En este trabajo se realizó el primer ensayo en Colombia usando el trasplante de autólogo de CGEO provenientes de mucosa nasal caudal para el tratamiento de lesión medular en caninos. Este estudio es el primer paso para la utilización de este tratamiento en pacientes animales y humanos con lesiones medulares en nuestro país. Para ello se estableció el grado de lesión medular en pacientes caninos con lesión traumática, mediante pruebas neurológicas clínicas, de imagenología (resonancia magnética) y por evaluación de la marcha, se evaluó la recuperación funcional propioceptiva, motora, sensitiva en los pacientes caninos con lesión sometidos al trasplante de CGEO. Finalmente se estableció el grado de recuperación medular luego del trasplante mediante pruebas neurológicas clínicas, el uso de resonancia magnética y la evaluación de la marcha.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la acción terapéutica del trasplante autólogo de CGEO en pacientes caninos con lesión medular.

Objetivos específicos

- Establecer el grado de lesión medular en pacientes caninos, mediante pruebas neurológicas clínicas, de imagenología (resonancia magnética) y mediante el análisis de la marcha.
- Evaluar la recuperación funcional propioceptiva, motora, sensitiva en los pacientes caninos con lesión sometidos al trasplante de CGEO.
- Establecer el grado de recuperación medular luego del trasplante mediante pruebas neurológicas clínicas, el uso de resonancia magnética y mediante el análisis de la marcha.

1.Revisión de literatura

1.1 Lesión medular

La lesión medular traumática afecta entre 250.000 y 500.000 personas cada año en el mundo y para aquellos individuos con las lesiones más severas su recuperación significativa es muy rara (Curt et al., 2008). El daño a la médula espinal provoca un deterioro neurológico que afecta las funciones motora, sensorial y autónoma. Las principales causas de lesión medular traumática son accidentes automovilísticos, caídas o actos de violencia. A nivel mundial se informa que la incidencia varía de 10 a 83 personas por millón (Blumer and Quine, 1995; Wyndaele and Wyndaele, 2006) y hay pocos estudios que hablen de la prevalencia estimándola entre 233 a y 755 por millón en todo el mundo (Wyndaele and Wyndaele, 2006). Dado el tamaño actual de la población estadounidense de 328 millones de personas un cálculo reciente mostró que la incidencia anual de LM es de aproximadamente 54 casos por millón, con unos 17.730 nuevos casos cada año de LM, estos no incluyen aquellos que mueren en el lugar del incidente que causó la LM. El número estimado de personas con LM que viven en los Estados Unidos es de aproximadamente 291.000 personas, con un rango de 249.000 a 363.000 personas (Jain et al., 2015).

Junto con la paresia con pérdida de movilidad y sensibilidad por debajo de la lesión, la LM deriva frecuentemente en la aparición de otros efectos que afectan negativamente la calidad de vida, entre los que destacan dolor espontáneo, espasticidad y en el caso de lesiones torácicas altas, disfunción autónoma, e incluye la presencia de vejiga neurogénica (Anderson, 2004; Nakae et al., 2011; Rabchevsky and Kitzman, 2011).

Muchos de los esfuerzos realizados por la neurociencia básica en la investigación de lesiones en el SNC se enfocan en el estudio de los mecanismos que subyacen al desarrollo del proceso lesivo, con el objetivo de activar o potenciar los sistemas de reparación innatos propios del SNC y de controlar o disminuir aquellos procesos que

producen daño en los tejidos, favoreciendo de esa manera la recuperación funcional. Dependiendo del nivel medular afectado se ocasiona un déficit funcional determinado, por lo que se hace necesario clasificarlo de manera exacta para determinar la severidad del daño, el pronóstico, el plan de rehabilitación y los posibles beneficios de una intervención quirúrgica específica. (Maynard et al., 1997; Harkey et al., 2003) . Por este motivo existen varias escalas que clasifican el nivel medular y el grado de afectación neurológico ocasionado en la LM, siendo la escala desarrollada por la Asociación Americana para la Lesión Medular (American Spinal Injury Association (ASIA) la más empleada en todo el mundo, la cual establece una clasificación de la severidad de la lesión en cinco grados determinados por la ausencia o preservación de la función motora y sensitiva (Ditunno et al., 1994). La LM presenta cambios moleculares y celulares que llevan a los síntomas reportados en los pacientes, sucediendo en dos eventos: la lesión primaria y la secundaria.

1.1.1. Fases fisiopatológicas de la lesión medular

Fisiopatológicamente se han descrito dos fases claras en la lesión medular, la lesión medular primaria y la secundaria. La primera inicia minutos después de la lesión y se caracteriza por una serie de cambios microvasculares que llevan a muerte neuronal y glial. En la fase secundaria de la lesión se produce una cascada de eventos celulares y moleculares que llevan a la generación de la cicatriz glial y que son en verdad los que inhiben la regeneración axonal y neural en el sitio (Park et al., 2012; Shende and Subedi, 2017).

1.1.2. Lesión medular primaria

La lesión medular primaria corresponde a las fuerzas mecánicas iniciales que recibe la médula espinal en el momento de la lesión, en las que fragmentos de hueso desplazados, materiales del disco y/o ligamentos se rasgan afectando la médula espinal (Sekhon and Fehlings, 2001; Oyinbo, 2011). Estas fuerzas dañan directamente las vías ascendentes y descendentes en la médula espinal, bloquean la circulación en los vasos sanguíneos, producen daño de membranas celulares (Rowland et al., 2008; Figley et al., 2014) causando shock espinal, hipotensión sistémica, vasoespasmo, isquemia, desequilibrio iónico y acumulación de neurotransmisores (Fehlings et al., 2012) (Fig. 1).

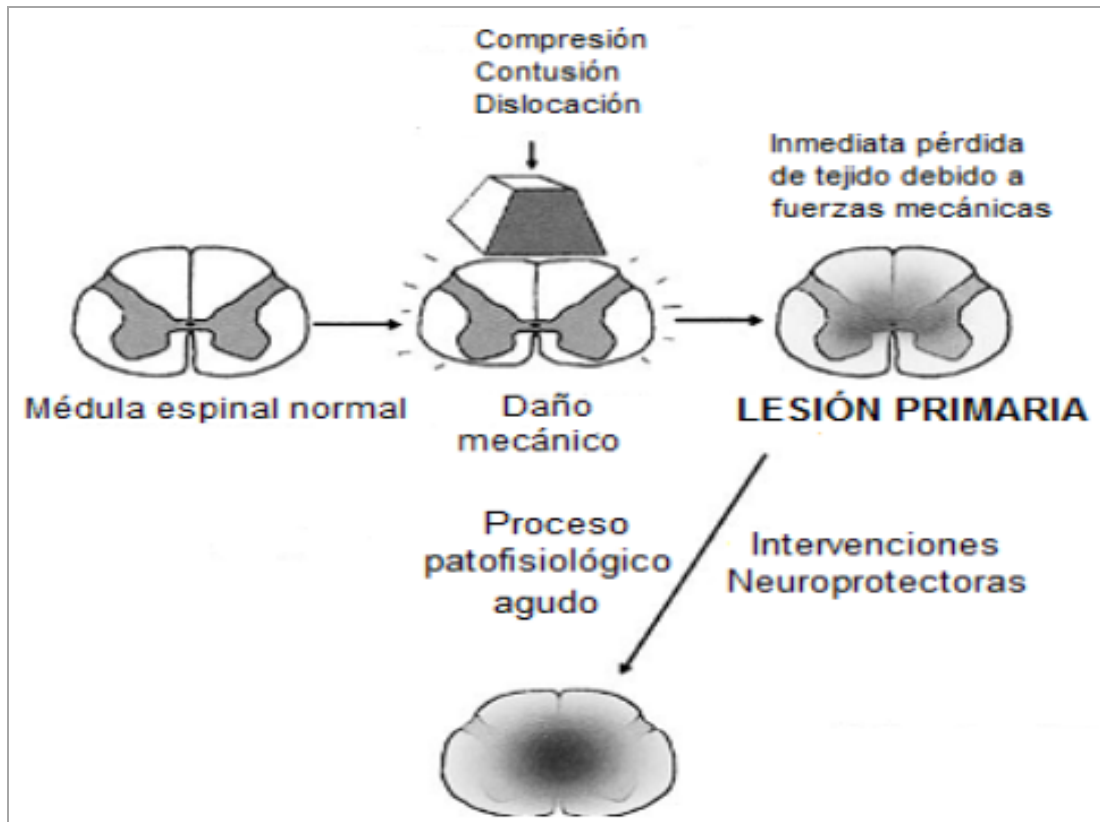


Figura 1-1. Lesión primaria y daño secundario posteriores a una lesión traumática de la médula espinal. Las fuerzas mecánicas al momento de la lesión son el detonante para que una serie de mecanismos auto-destructivos lleven a la pérdida del tejido adyacente al sitio de la lesión que es altamente vulnerable a sufrir daño irreversible, este evento es el que se denomina lesión secundaria y a estos eventos agudos de daño están dirigidas las terapias neuroprotectoras (Modificado de Known y cols., 2004).

La fuerza mecánica inicial tiende a dañar principalmente la sustancia gris, generando una zona de necrosis hemorrágica y preservando relativamente la sustancia blanca periférica, así mismo la interrupción del flujo sanguíneo genera un infarto local provocado por un aporte insuficiente de oxígeno (hipoxia) y nutrientes (isquemia). Como consecuencia las neuronas y los terminales nerviosos se ven alterados de forma mayoritaria y sufren perturbaciones funcionales y bioquímicas en el área de lesión que afectan tanto a la sustancia gris como a la sustancia blanca durante el transcurso de las primeras horas posteriores a la lesión (Kwon et al., 2004; Profyris et al., 2004; Rowland et al., 2008). Los cambios microvasculares iniciales (microhemorragias y edema) llevan a una demielinización y degeneración neuronal, glial y axonal con hinchamiento neuronal y glial y vesiculación de la mielina, disolución granular del axoplasma, seguido de daño a las membranas celulares y vacuolización mitocondrial; estas lesiones pueden verse entre 15 minutos y dos horas posteriores al traumatismo. Hoy en día la cirugía temprana de descompresión (menos de 24 horas de la lesión) de la médula

espinal, es el tratamiento clínico más efectivo para limitar el daño tisular de una lesión primaria (Fehlings et al., 2012; Wilson et al., 2017).

1.1.3 Lesión medular secundaria

Los daños ocasionados por la lesión primaria inicial generan la activación de mecanismos bioquímicos y fisiológicos desencadenando un estado que denominamos lesión secundaria, los que finalmente afectan la función neuronal aumentando el daño inicial, algunos de ellos son: edema, isquemia, shock neurogénico, desequilibrio electrolítico, reacción inflamatoria, reperusión exitoxicidad, alteración de la función mitocondrial, apoptosis, reactividad glial, aumento del calcio intracelular (Tator and Fehlings, 1991; Nagoshi and Okano, 2018) (Fig. 2).

Los eventos fisiopatológicos de este proceso secundario se pueden dividir temporalmente en diferentes fases: 1-aguda, 2-subaguda y 3-crónica (Rowland et al., 2008; Kim et al., 2017). Muchas de las células participantes residen en la médula espinal, pero otras son convocadas al sitio de la lesión desde el sistema circulatorio. Dado que la lesión secundaria es un proceso continuo, algunos eventos de la fase aguda continúan en la subaguda y algunos de la subaguda continúan en la crónica (Oyinbo, 2011).

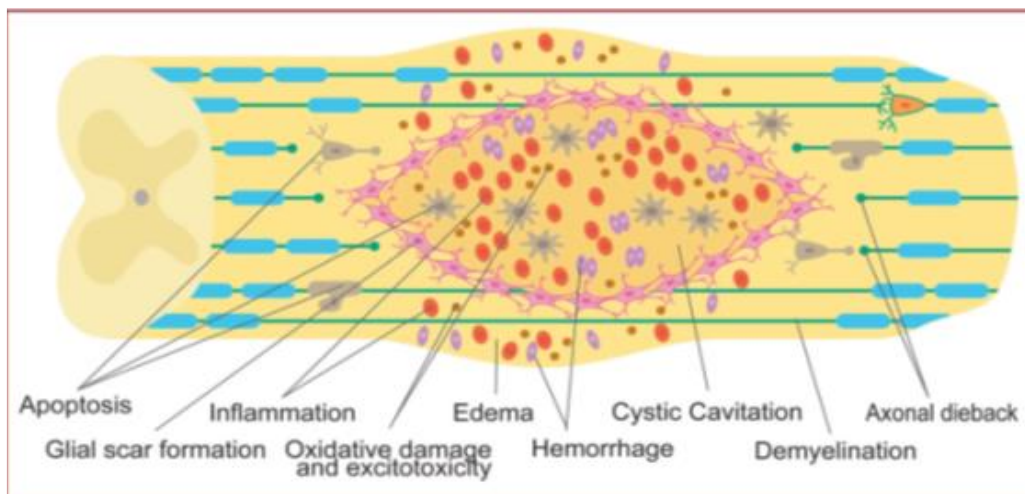


Figura 1-2. Tres fases fisiopatológicas después de la lesión medular. Aguda (hemorragia, edema, inflamación). Subaguda (demielinización y muerte axonal). Crónica (formación de cavidad). La lesión primaria es causada por las fuerzas mecánicas del evento traumático inicial. La secundaria se refiere al daño progresivo el cual incluye inflamación, pérdida de homeostasis iónica, daño oxidativo, exitotoxicidad, apoptosis y necrosis. Los oligodendrocitos son altamente susceptibles a la apoptosis resultando en demielinización axonal. Hay formación de cavidad quística en la médula espinal, con formación de una cicatriz glial. Las células no astrocíticas forman principalmente una barrera química al secretar factores que inhiben el crecimiento axonal (CSPGs). Downloaded from https://academic.oup.com/neurosurgery/article-abstract/64/CN_suppl_1/119/4093182 by guest on 25

Fase aguda (2-48 horas)

Luego de la fase inicial el daño axonal y la muerte celular se ven exacerbados por la producción de radicales libres, la desregulación iónica, la excitotoxicidad por presencia de glutamato, la respuesta inflamatoria, el edema, peroxidación de lípidos y muerte celular necrótica (Rowland et al., 2008; Oyinbo, 2011; von Leden et al., 2017). Se sabe que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) es máxima un día después de producirse la lesión, lo cual facilita la extravasación de proteínas plasmáticas que contribuyen al aumento del daño secundario, con el paso del tiempo esta permeabilidad va disminuyendo de forma gradual (Figley et al., 2014). Al mismo tiempo van apareciendo diversas poblaciones celulares como monocitos, neutrófilos, macrófagos y microglía activa que van acudiendo a la zona lesionada durante la fase aguda y subaguda (Fig. 3). Aunque en general se ha considerado perjudicial la respuesta inflamatoria, diversas evidencias científicas sugieren que la modulación de este evento biológico contribuiría a reducir el daño secundario y promover la resolución tisular (David et al., 2012a).

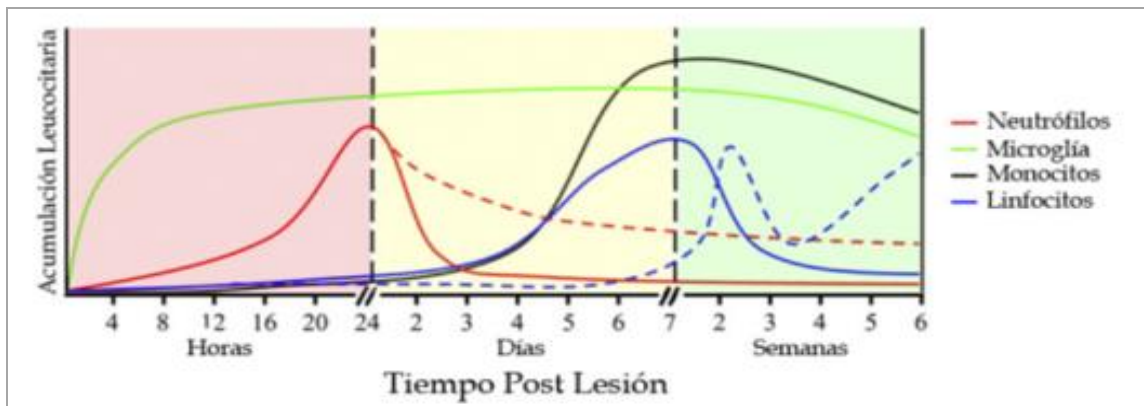


Figura 1-3. Evolución temporal de la infiltración de los diferentes tipos de células inmunes tras una lesión medular. Las líneas discontinuas representan la evolución en ratones y las continuas a la evolución en ratas. La línea continua anterior a la aparición de la discontinua indica que la infiltración sigue la misma evolución en ambas especies. (Adoptado de (Donnelly and Popovich, 2008).

Fase subaguda (2 semanas a 2 meses)

A medida que avanza la lesión involucra apoptosis, desmielinización de axones supervivientes, muerte regresiva axonal, remodelación de la matriz y evolución de una cicatriz glial alrededor del sitio de la lesión. Los axones lesionados presentan en su parte distal seccionada una progresiva fragmentación con posterior fagocitosis conduciéndolo a

una completa eliminación, proceso conocido como degeneración walleriana.(Profyris et al., 2004; Lingor et al., 2012).

Fase crónica (6 meses en adelante)

Continúa la degeneración walleriana y la formación y estabilización de la cicatriz glial (Rowland et al., 2008; Alizadeh et al., 2015; Tran et al., 2018). Se produce un proceso de cavitación quística y mielomalacia, que representa la etapa final de la muerte celular luego de la LM traumática. Los quistes se presentan rodeados de una delgada pared astrogliar, albergando en su interior líquido extracelular, fragmentos de tejido conectivo y macrófagos residuales (Norenberg et al., 2004).

1.1.4 Mecanismos principales del daño secundario

Para la planificación de posibles estrategias terapéuticas es un requisito necesario comprender los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño secundario de pacientes con lesión medular traumática, estos mecanismos conllevan a procesos de muerte celular que gobiernan la biología de la lesión secundaria, entre ellos se destacan:

Muerte celular

La muerte celular es un evento importante en los mecanismos de lesión secundaria que afecta las neuronas y la glia después de la LM (Beattie et al., 2002; Dyck et al., 2019). La necrosis y la apoptosis se identificaron originalmente como dos mecanismos principales de muerte celular después de la LM (Wang et al., 2013).

Sin embargo, investigaciones recientes han descubierto formas adicionales de muerte celular. El Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular en 2012 (CNMC) definió formas diferentes de muerte celular como necroptosis, piroptosis y netosis (Galluzzi et al., 2012). En el caso de la LM la apoptosis, necrosis, necroptosis y autofagia han sido los más estudiados.

Como resultado del daño mecánico producido por una lesión traumática espinal varias poblaciones celulares mueren inmediatamente, dicha muerte celular se limita a la zona afectada por el trauma. Fundamentalmente esa muerte se presenta por medio de dos procesos; necrosis y apoptosis. Durante la evolución de la patología se pueden distinguir

dos fases: una inicial en la que predomina la muerte por necrosis que involucra varios tipos celulares (neuronas y glia) tanto en la sustancia gris como en la blanca y una fase posterior gobernada por la apoptosis y limitada principalmente a la sustancia blanca afectando principalmente a los oligodendrocitos, lo que lleva a un proceso de desmielinización tardía. (Takahashi et al., 2005; Oyinbo, 2011).

La necrosis se produce debido a una multitud de factores que incluyen la acumulación de componentes sanguíneos tóxicos, la excitotoxicidad del glutamato y el desequilibrio iónico (Gudz et al., 2006), la depleción de ATP (Matute et al., 2007), la liberación de citocinas proinflamatorias por los neutrófilos y los linfocitos (Takahashi et al., 2003) y la formación de radicales libres (Beattie et al., 2000). Originalmente se pensó que la necrosis es causada por un impacto severo en una célula que da como resultado una rápida inflamación y lisis celular.

La apoptosis juega un papel importante en la lesión medular, involucra una serie de proteasas que inducen cambios en la regulación genética y una muerte ordenada con un proceso molecular complejo siendo la caspasa 3 el efector común de múltiples vías de apoptosis. Por lo tanto, el nivel de caspasa 3 puede reflejar el grado de apoptosis (Masumoto et al., 2003). Es de gran importancia entonces estudiar métodos para reducir la apoptosis de las neuronas de la médula espinal en el tratamiento y reparación de lesiones medulares.

La apoptosis se induce a través de vías extrínsecas e intrínsecas basadas en el mecanismo de activación. La vía extrínseca se desencadena por la activación de receptores de muerte como FAS y TNFR1, que eventualmente activa la caspasa 8 (Zhang et al., 2012). La vía intrínseca, sin embargo, está regulada a través de un equilibrio entre las proteínas intracelulares pro y antiapoptóticas y se desencadena por la liberación de citocromo C de las mitocondrias y la activación de la caspasa 9 (Zhang et al., 2012). En la lesión de la médula espinal, la apoptosis se produce principalmente debido al influjo de Ca^{2+} inducido por la lesión, que activa las caspasas y la calpaína; enzimas implicadas en la degradación de proteínas celulares (Oyinbo, 2011). Además, se cree que la muerte de neuronas y oligodendrocitos en áreas remotas del epicentro de la lesión puede ser mediada por citocinas como TNF- α NPCs, daño por radicales libres y

excitotoxicidad, ya que el calcio de las células dañadas dentro de la lesión apenas llega a estas áreas remotas (Amemiya et al., 2005).

La necroptosis una forma distinta de muerte celular a la apoptosis y a la necrosis ha sido descuidada por largo tiempo en la patología de LM. La necrosis programada o "necroptosis" se ha descrito más recientemente como una muerte celular altamente regulada, independiente de la caspasa, con características morfológicas similares a la necrosis, siendo un proceso medido por receptores (Dunai et al., 2011). Se induce corriente abajo del receptor 1 de TNF (TNFR1) y depende de la actividad de la proteína quinasa 1 que interactúa con el receptor (RIPK1) y (RIPK3). Estudios recientes han descubierto un papel clave para RIPK1 como mediador de la necroptosis y regulador de la respuesta inmune innata involucrada tanto en la inflamación como en la muerte celular (Liu et al., 2018). La evidencia de los estudios de LM muestra que el daño lisosómico puede potenciar la necroptosis al promover la acumulación de RIPK1 y RIPK3 (Liu et al., 2018). Este tipo de "muerte celular necrótica programada" puede iniciarse incluso en presencia de inhibidores clásicos de caspasa utilizados para bloquear la apoptosis. Liu y sus colegas proporcionaron recientemente evidencia de que la necroptosis desempeña un papel destacado como mecanismo de muerte celular neuronal luego de LM (Liu et al., 2015). Se descubrió que la necrostatina-1 un inhibidor específico de la necroptosis era neuroprotectora y disminuía el tamaño de la lesión después de LM a través de una acción protectora sobre las mitocondrias (Liu et al., 2015; Wang et al., 2015).

Normalmente, la autofagia juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células al ayudar en la renovación de proteínas y orgánulos, desafortunadamente en LM también se presenta una desregulación en la autofagia lo que conlleva a pérdida de neuronas. (Liu and Levine, 2015). En la autofagia, las células degradan proteínas y orgánulos citoplásmicos dañinos, defectuosos o innecesarios a través de un mecanismo dependiente de lisosomas (Mizushima, 2007; Zhou et al., 2017). La autofagia inicia con la formación de un autofagosoma alrededor de proteínas y orgánulos que están marcados para la autofagia. Luego se lleva a cabo la fusión con el lisosoma formando un autolisosoma iniciando un proceso de reciclaje (Mizushima, 2007). Las neuronas con autofagia desregulada exhiben una mayor expresión de caspasa 12 y se vuelven más propensas a la apoptosis (Liu and Levine, 2015). La autofagia promueve

la supervivencia celular mediante la eliminación de proteínas tóxicas y mitocondrias dañadas (Yu et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Inflamación

En general la inflamación es la adaptación homeostática del cuerpo en respuesta a lesiones localizadas y es fundamental para reparar y limitar el daño tisular si las vías compensatorias siguen siendo funcionales. De lo contrario un estado descompensatorio lleva a una desregulación multiorgánica y a la muerte (David et al., 2012b; Allison and Ditor, 2015; Anwar et al., 2016). En general, la extensión de la lesión primaria determina la gravedad y resultado de la LM (Wilson et al., 2011).

El complemento es activado casi inmediatamente después de la LM, se incrementa en el primer día y persiste allí crónicamente (Peterson and Anderson, 2014). Esta elevación del complemento es además detectable en el suero de modelos animales de LM y puede llegar a ser un biomarcador en pacientes humanos (Brennan et al., 2015).

Específicamente en LM se produce ruptura o distorsión de la médula, daño en axones, vasos sanguíneos y neuronas incluido el cizallamiento o estiramiento de las membranas celulares a partir de lo cual emana el perfil temporal del daño secundario que puede extenderse a meses o años. Este medio inicia una lesión secundaria con cascadas inflamatorias derivadas de la respuesta inmune innata (neutrófilos, monocitos, macrófagos, células residentes del parénquima del SNC astrocitos y microglía) y respuesta inmune adaptativa (linfocitos T y B). La variedad de inflamógenos liberados encapsula citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12) / quimiocinas (CXCL1, CXCL12), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), oxidantes, iones glutaminérgicos, proteasas (metaloproteinasas de matriz, calpaínas, caspasas), proteínas del complemento. En última instancia, el resultado de la acción de estos mediadores es la muerte celular necrótica y apoptótica con un impacto en el comportamiento funcional (autónomo, motor, sensorial y reflejo), (David et al., 2012b; Allison and Ditor, 2015; Anwar et al., 2016). Paralelamente, se produce una respuesta antiinflamatoria compensatoria proveniente de las mismas células con un fenotipo diferente para reparar, ser neuroprotectora y neuroregenerativa (Cherry et al., 2014; Witcher et al., 2015). Hasta la fecha, el tratamiento clínico más eficaz para limitar el daño tisular después de una lesión primaria es el procedimiento quirúrgico

descompresión (<24 h después de la lesión) de la médula espinal lesionada (Fehlings et al., 2012; Wilson et al., 2017).

Daño oxidativo, exitotoxicidad e imbalance iónico.

En individuos sanos la actividad de las especies reactivas de oxígeno (radicales libres RL y EROs) está equilibrada con agentes antioxidantes celulares. En los sujetos con LM, se crea un medio que impulsa un cambio en el equilibrio hacia el estrés oxidativo que junto con otras señales se convierte en una patología inflamatoria (Bains and Hall, 2012; Anwar et al., 2016; Alizadeh et al., 2019). El aumento del estrés oxidativo también se correlaciona con la progresión de la edad, pues hay una disminución recíproca en las concentraciones de antioxidantes. En consecuencia, la gravedad de la LM aumenta con la edad y depende del equilibrio pro-oxidante / antioxidante (Shao et al., 2006; Anwar et al., 2016).

En LM el parénquima activo (microglía) y los leucocitos (macrófagos y neutrófilos) son las principales fuentes de EROs (Bains and Hall, 2012).

Los principales componentes de EROs son los superóxidos (O_2^-), radicales hidroxilo (OH, producto de la reacción de Fenton), peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (ON) y peroxinitritos ($ONOO^-$) entre otros (Xiong and Hall, 2009; Yang et al., 2013). Siendo estos sintetizados por sistemas enzimáticos (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, mieloperoxidasas, ciclooxigenasa y xantinaoxidasa), tanto en microglía como en leucocitos (D'Autréaux and Toledano, 2007; Bains and Hall, 2012). La oxidación de lípidos y proteínas es uno de los mecanismos clave de lesión secundaria en LM y los efectos perjudiciales de las vías del estrés oxidativo inician inmediatamente después del impacto primario de LM que causa daño a las membranas celulares (Silva et al., 2014; Alizadeh et al., 2019). La oxidación de lípidos comienza cuando los EROs interactúan con ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular generando lípidos reactivos que luego formarán radicales lípido peroxilos al interactuar con radicales libres superóxidos (Hall, 2011; Alizadeh et al., 2019). Cada radical lípido peroxilo puede reaccionar con un ácido graso vecino convirtiéndolo en un lípido activo comenzando una reacción en cadena que continúa hasta que no hay más lípidos insaturados disponibles o terminando cuando el lípido reactivo apaga con otro radical. Los productos finales de este paso "paso de terminación" de la peroxidación lipídica es 4-hidroxinonenal (HNE) y 2-

propenal que son altamente tóxicos para las células (Hall, 2011; Alizadeh et al., 2019). La oxidación enzimática (ciclooxigenasa) y no enzimática del ácido araquidónico produce 8-isoprostaglandina F2a, siendo este otro marcador de peroxidación lipídica (Clausen et al., 2012). Los aldehídos reactivos dañan la barrera sanguínea de la médula espinal (BSME) provocando una disminución de la viabilidad celular (Ayala et al., 2014; Anwar et al., 2016) y por lo tanto un aumento de la permeabilidad vascular (Huber et al., 2002). Por el contrario, los productos finales de la peroxidación de lípidos son inactivados por aldehído deshidrogenasas y otras enzimas como las aldehído reductasas, glutatión S-transferasas (Ayala et al., 2014; Anwar et al., 2016). Además de la peroxidación lipídica asociada a EROS, los amino ácidos están sujetos a un daño oxidativo significativo asociado a especies reactivas de nitrógeno ERNS que contienen (ONOO-) que pueden nitrar residuos de tirosina de aminoácidos para formar 3-nitrotirosina (3-NT) que también es un marcador de daño de proteína mediado por peroxinitrito (ONOO-). La oxidación de lípidos y proteínas después de LM tiene un número de consecuencias perjudiciales a nivel celular que incluyen insuficiencia respiratoria y metabólica mitocondrial, así como alteración del ADN que finalmente conducen a la muerte celular (Cuzzocrea et al., 2001; Alizadeh et al., 2019).

Pocos minutos después de la lesión medular primaria, la combinación de daño celular directo e isquemia hipoxia desencadenan una elevación significativa de glutamato extracelular, el principal neurotransmisor excitatorio del SNC (Oyinbo, 2011; Mazzone et al., 2017). El glutamato se une a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y Kainato), también a receptores metabotrópicos dando como resultado una entrada de calcio a las células (Gottlieb and Matute, 1997; Karadottir and Attwell, 2007; Bains and Hall, 2012). El efecto del glutamato no está restringido a las neuronas, sus receptores son ampliamente expresados en todas las células gliales y células endoteliales (Karadottir and Attwell, 2007; Vanzulli and Butt, 2015). Un aumento de larga duración en la concentración de Calcio en el citosol, las mitocondrias o retículo endoplásmico tiene consecuencias perjudiciales para la célula (Ferryhough and Calcutt, 2010; Pivovarova and Andrews, 2010; Bains and Hall, 2012). En las neuronas durante la excitotoxicidad inducida por glutamato la sobreactividad del receptor NMDA conduce a una sobrecarga de calcio mitocondrial, que puede causar la muerte celular apoptótica o necrótica (Pivovarova and Andrews, 2010; Alizadeh et al., 2019). En la sustancia blanca lesionada, los astrocitos, los oligodendrocitos y la mielina se ven afectados por la mayor liberación de glutamato y

la excitotoxicidad dependiente de calcio (Li and Stys, 2000). Dentro de las primeras pocas horas después de la lesión, los oligodendrocitos muestran signos de activación de caspasa 3 y otras características apoptóticas y su densidad declina (Xu et al., 2008; Alizadeh et al., 2019). La sobrecarga de calcio mitocondrial impide la respiración mitocondrial y da como resultado un agotamiento de ATP que inhabilita la ATPasa de Na^+ / K^+ aumentando el Na^+ intracelular (Li and Stys, 2001; Duchen, 2004; Pandya et al., 2013). Esto invierte la función del transportador de glutamato dependiente de Na^+ que normalmente utiliza el gradiente de Na^+ para transferir glutamato a las células (LoPachin et al., 1999; Li and Stys, 2001; McAdoo et al., 2005; Alizadeh et al., 2019).

Además, el exceso de Na^+ intracelular invierte la actividad del intercambiador de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ permitiendo más influjo de Ca^{2+} (Stys et al., 1992; Bains and Hall, 2012; Alizadeh et al., 2019). La despolarización celular activa los canales de Na^+ activados por voltaje que resultan en la entrada de Cl^- y agua en las células junto con sodio causando hinchazón y edema (Regan and Choi, 1991; Alizadeh et al., 2019). El incremento en la concentración de Na^+ sobreactiva el intercambiador Na^+ / H^+ provocando un aumento de H^+ a nivel intracelular (Reithmeier, 1994; Agrawal and Fehlings, 1996; Alizadeh et al., 2019). La acidosis intracelular resultante aumenta la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} lo que exacerba el desequilibrio iónico inducido por la lesión. (Reithmeier, 1994; Agrawal and Fehlings, 1996; Alizadeh et al., 2019). Los axones son más susceptibles al daño causado por el desequilibrio iónico debido a su alta concentración de canales de Na^+ activados por voltaje en los nodos de Ranvier (Oyinbo, 2011).

Cicatriz glial

La LM traumática desencadena la formación de un tejido cicatricial glial alrededor del epicentro de la lesión (Cregg et al., 2014). La cicatriz glial es un fenómeno multifactorial al que contribuyen varias poblaciones de la médula espinal lesionada, incluidos los astrocitos activados, las células precursoras de oligodendrocitos (CPOs) NG2^+ , la microglía, los fibroblastos y los pericitos junto con las moléculas de la matriz extracelular (MEC) (Adams and Gallo, 2018). En lesiones penetrantes en las que se ven comprometidas las meninges, los fibroblastos meníngeos también infiltran el epicentro de la lesión (Bundesen et al., 2003). Los fibroblastos contribuyen a la producción de fibronectina, colágeno y laminina en la MEC de la médula espinal lesionada y son una fuente de moléculas que repelen los axones, como las semaforinas, que influyen en la

regeneración axonal después de la LM. También se han encontrado fibroblastos en lesiones contusivas donde las meninges están intactas (Göriz et al., 2011; Soderblom et al., 2013). Los estudios que utilizan el mapeo genético de destino en estas lesiones han revelado que los pericitos y fibroblastos perivasculares migran al sitio de la lesión y forman un núcleo fibrótico en la cicatriz que madura dentro de las 2 semanas posteriores a la lesión (Göriz et al., 2011; Soderblom et al., 2013). La LM también desencadena la proliferación y migración del grupo de células madre / progenitoras del parénquima y epéndima de la médula espinal. Estas células pueden dar lugar a nuevos astrocitos y CPOs que forman las cicatrices (Barnabé-Heider et al., 2010; Hughes et al., 2013).

En una cicatriz glial madura, las microglías / macrófagos activados ocupan la parte más interna y cercana al epicentro de la lesión rodeada de CPOs NG2 +, mientras que los astrocitos reactivos residen en la penumbra de la lesión y forman una barrera celular (Cregg et al., 2014). Es de destacar que en la LM humana, la cicatriz glial comienza a formarse dentro de las primeras horas después de la LM y permanece crónicamente en el tejido de la médula espinal (Huang et al., 2014). La cicatriz glial se ha encontrado dentro de la médula espinal humana lesionada hasta 42 años después de la lesión (Cregg et al., 2014). Los astrocitos reactivos juegan un papel principal en la formación de la cicatriz glial (Cregg et al., 2014). Luego de la LM, los astrocitos aumentan su expresión de filamentos intermedios, proteína fibrilar glial ácida (GFAP), nestina y vimentina, y se hipertrofian (Sun et al., 2010). Los astrocitos reactivos proliferan y se movilizan hacia el sitio de la lesión y forman una estructura de malla de procesos filamentosos entremezclados alrededor del epicentro de la lesión (Wanner et al., 2013). Se ha demostrado que la cicatriz glial astrocítica sirve como una barrera protectora que evita la propagación de las células inmunitarias infiltradas en los segmentos adyacentes (Wanner et al., 2013; Cregg et al., 2014). La astrogliosis reactiva también es esencial para la reconstrucción de la BSM, y bloquear este proceso conduce a una infiltración de leucocitos exacerbada, muerte celular, daño de la mielina y una recuperación funcional reducida (Herrmann et al., 2008). A pesar del papel protector de la cicatriz glial astrocítica en la LM aguda, su evolución y persistencia en las etapas subaguda y crónica de la lesión se ha considerado un potente inhibidor de la reparación y regeneración de la médula espinal (Yuan and He, 2013). Varias moléculas inhibitoras se han asociado con astrocitos activados y sus productos secretados, como proteoglicanos y tenascina-C (Wiese et al., 2012). Por lo tanto, la manipulación de la cicatriz astrocítica se ha

perseguido como una estrategia de tratamiento prometedora para la LM (Cregg et al., 2014). Los proteoglicanos de condroitín sulfato (CSPG) son bien conocidos por su contribución al papel inhibitorio de la cicatriz glial en la regeneración axonal (Tom et al., 2009) en brote axonal (Alilain et al., 2011), en la conducción (Petrosyan et al., 2013) y remielinización (Dyck et al., 2018). En condiciones normales, los niveles basales de CSPG que se expresan en el SNC desempeñan funciones críticas en la guía neuronal y la estabilización de la sinapsis (Dyck and Karimi-Abdolrezaee, 2015). Después de la lesión, los CSPG (neurocan, versican, brevican y fosfacan) se regulan positivamente y alcanzan su pico de expresión 2 semanas después de la LM y permanecen regulados positivamente de forma crónica (Buss et al., 2009). Una extensa investigación en las últimas décadas ha demostrado el efecto inhibitorio de los CSPG sobre la regeneración de axones (Asher et al., 2000). Sin embargo, la evidencia emergente ha identificado a los CSPG como unos importantes reguladores de la respuesta celular endógena inhibiendo principalmente a los oligodendrocitos (Dyck et al., 2015; Dyck et al., 2018). El reemplazo de oligodendrocitos es un proceso de reparación importante en LM y otras condiciones desmielinizantes como la esclerosis múltiple EM (Dyck and Karimi-Abdolrezaee, 2015). En ambas condiciones se desencadena la activación de las CPOs endógenas y su movilización al sitio de la lesión (Almad et al., 2011; Lau et al., 2012). La evidencia in vitro e in vivo muestra que los CSPG limitan el reclutamiento CPOs e inhiben la supervivencia, diferenciación y maduración de los oligodendrocitos (Dyck et al., 2015; Dyck et al., 2019). Mecánicamente los efectos inhibitorios de los CGPG sobre el crecimiento de axones y la diferenciación de células endógenas se rigen principalmente por la señalización a través de la proteína receptora tirosina fosfatasa sigma (RPTPs) y el receptor de fosfatasa relacionada con el antígeno común de los leucocitos (LAR) (Lang et al., 2015). Dyck et al., 2018 demostraron que los GSPG inducen apoptosis mediada por caspasa-3 en CPOs in vitro y en oligodendrocitos en LM que está mediada por RPTPs y LAR (Dyck et al., 2018).

Existen otras moléculas inhibitorias de la neurogénesis en la región de la cicatriz glial responsables adicionalmente de la baja capacidad de regeneración axonal. Algunas de las más reportadas son los inhibidores asociados a mielina (MAIs) como la glicoproteína de oligodendrocito-mielina (OMgp), NogoA, y la glicoproteína asociada a mielina (MAG). (Cao et al., 2010). El MAG fue el primero en ser reportado, es una molécula de acción dual que promueve el crecimiento axonal en neuronas en desarrollo mientras que tiene acción inhibitoria en neuronas maduras (Lee and Zheng, 2012). Nogo es un gen

que se expresa ubicuamente y que tiene cuatro miembros en mamíferos (RTN1, RTN2, RTN3 y RTN4 o Nogo). Nogo A es codificado por el gen RTN4 y se expresa preferentemente en OL, CS y en neuronas con bajos niveles de mielina. Mediante modelos genéticos de delección se ha demostrado que esta molécula limita la regeneración del SNC lesionado y que su inhibición mejora la recuperación motora y la reconexión de axones (Akbik et al., 2012). La baja capacidad de regeneración axonal se ve influenciada también por la disminución de algunos factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF); el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y las neurotrofinas (NT) 3 y 4, las que promueven el crecimiento axonal, mediante la activación de receptores tirosina kinasa que activan proteínas G como Ras, Rap-1 y Cdc-42 (Huang and Reichardt, 2003).

En lesiones de SNC en mamíferos adultos se han descrito como inhibidores de la regeneración axonal otras proteínas que incluyen miembros de las netrinas, las efrinas y la familia de las semaforinas (Sem), estas últimas son una familia de proteínas celulares secretadas y asociadas a membrana, que están relacionadas en la guía, la dirección y fasciculación de axones, actuando como repelentes de axones por unión al complejo neuropilina-plexina (de Castro, 2009). Las semaforinas 3, 4, 6 y 7 están presentes en la cicatriz glial, la inhibición de las semaforinas 3, 4, 6 incrementa la recuperación funcional en modelos animales (Kopp et al., 2010).

Anderson y cols., 2016 han cuestionado recientemente los efectos inhibidores de la cicatriz glial astrocítica sobre la regeneración axonal después de la LM. Utilizando ratones adultos manipulados genéticamente, mostraron que la prevención de la formación de cicatrices astrocíticas, la atenuación de los astrocitos formadores de cicatrices o la eliminación de cicatrices crónicas de astrocitos no dieron como resultado un recrecimiento espontáneo de axones corticoespinales, sensoriales o serotoninérgicos seccionados a través de lesiones graves de médula espinal. En contraste la entrega sostenida mediante un hidrogel de factores de crecimiento específicos de axón, que no están presentes en las lesiones, además de lesiones de cebado, que activan el crecimiento, estimularon el crecimiento robusto de axones sensoriales más allá de los astrocitos formadores de cicatrices y de moléculas inhibitoras en LM. La prevención de la formación de cicatrices de astrocitos redujo significativamente este recrecimiento estimulado de axones. La secuenciación del ARN reveló que los astrocitos y las células que no son astrocitos en LM expresan múltiples moléculas de apoyo al crecimiento de

axones. Anderson et al, muestran que, contrariamente al dogma predominante, la formación de cicatrices de astrocitos ayuda en lugar de prevenir la regeneración de axones del SNC (Anderson et al., 2016).

1.1.5 Características de lesión medular en caninos

Existen dos etiologías principales que producen lesión medular aguda en caninos, el trauma directo inducido por lesión por contusión, compresión, fractura o luxación vertebral y la hernia discal intervertebral espontánea (HDIE) (adquirida o hereditaria) secundaria a degeneración y calcificación del núcleo pulposo afectando principalmente a razas condrodistróficas (dachshunds, beagles, etc) (Olby et al., 2004; Bergknut et al., 2012). La lesión más frecuente es la hernia, que se presenta en la mayoría de los casos en la región toraco lumbar (Smith and Jeffery, 2006), siendo similar a la que se reporta en humanos a nivel torácico medio. La gravedad de la lesión medular causada por HDIE abarca una lesión sensoriomotora completa de la cual se han propuesto patrones (escalas) predecibles de recuperación a través de diferentes severidades (Olby et al., 2004; Bergknut et al., 2012) similares a las escalas ASIA propuestas para la lesión en humanos.

Las evaluaciones de la Asociación Estadounidense de Lesiones Espinales (ASIA) son los instrumentos que se utilizan con más frecuencia en los ensayos clínicos de lesiones de la médula espinal en humanos (Steeves et al., 2007). En este sistema la función sensorial se puntúa de 0 a 2 y la función motora de 0 a 5. La puntuación de deterioro de ASIA varía desde la pérdida completa de la sensación y el movimiento ASIA A hasta la función neurológica normal ASIA E (Kirshblum et al., 2020). La pérdida completa de la motricidad y la conservación de algunas funciones sensoriales por debajo del nivel neurológico de la lesión se clasifica como ASIA B, si la función motora también se salva por debajo del nivel de la lesión, la puntuación puede ser ASIA C o D. La validez y reproducibilidad del sistema ASIA, combinadas con su precisión en la predicción de los resultados de los pacientes, lo han convertido en el sistema de puntuación clínico más aceptado y fiable utilizado para la clasificación neurológica de LM (Kirshblum et al., 2020)

En caninos Olby et al., 2001 desarrollaron un sistema de puntuación de la marcha basado en cinta rodante con una amplia gama de gravedad de lesiones de la médula espinal toracolumbar para cuantificar de forma precisa y fiable la función de las

extremidades traseras. Esta escala ordinal para puntuar la marcha va de un puntaje mínimo de 0 (paraplejía sin nocicepción) a un máximo de 14 (marcha normal de miembros pélvicos) teniendo en cuenta la capacidad de paso y su coordinación (Olby et al., 2001; Olby et al., 2014).

En perros con lesiones incompletas se observa a menudo una recuperación neurológica significativa. En E.U. lesiones de HDIE en perros equivalentes a lesiones ASIA A se traducen en 2.000 a 3.000 casos por año proporcionando un adecuado modelo clínico para el estudio de lesión medular (Moore et al., 2016).

1.2 Células de la glía envolvente olfatoria

1.2.1 Generalidades

Uno de los pocos lugares del cuerpo en el que se produce una continua neurogénesis y crecimiento axonal durante toda la vida de un organismo es el epitelio olfatorio. Esto se demostró desde 1979, en estudios en donde se utilizó marcaje con timidina tritiada y análisis cuantitativos, que demostraron que las neuronas olfatorias poseían una vida media corta, permaneciendo en el epitelio olfatorio durante aproximadamente 28 días y que eran reemplazadas por otras nuevas procedentes de la división de células basales del epitelio olfatorio (Graziadei and Graziadei, 1979) (Fig. 1.4). Independientemente de la causa de la muerte, los axones de las nuevas neuronas olfatorias deben crecer en la dirección correcta y extenderse a través del epitelio olfatorio (SNP), atravesar la lámina cribosa del etmoides, penetrar el bulbo olfatorio (SNC) pasar la glía limitante y realizar sinapsis con las dendritas de segundas neuronas de la vía olfatoria y restablecer la conductividad. Para llevar a cabo este cometido, los axones están rodeados de unas células que los acompañan en todo su recorrido denominadas células de la glía envolvente olfatoria (CGEO) (Graziadei and Graziadei, 1979).

Conociendo la capacidad de regeneración de las neuronas olfatorias, Doucette en 1990 propuso que serían las células de la glía envolvente (CGEO) las que podrían directa o indirectamente promover esta capacidad tanto en el SNC (bulbo olfatorio) como en el SNP (Doucette, 1990).

Las CGEO son un tipo especial de glía, que está presente en la lámina propia de la mucosa olfatoria (MO) (Doucette, 1984; Au et al., 2002) así como en las capas externas del bulbo olfatorio (Ramon-Cueto and Avila, 1998; Lu et al., 2001) (Fig. 4) y envuelven múltiples axones primarios no mielinizados en grupos conocidos como fascículos. Estas células expresan muchos marcadores específicos por localización, por ejemplo las CGEO del bulbo olfatorio expresan p75NTR, S100b, GFAP, y neuropéptido Y (NPY) y las de la lámina propia son positivas para CD 44, B1 integrina, P200, Notch3, NG2, VEGF. Parece ser que esta variación en los perfiles antigénicos puede estar relacionada con diferencias en la función, que pueden significar un papel diferente en regeneración neuronal y en el crecimiento axonal (Au and Roskams, 2003; Su and He, 2010).

Con el conocimiento de las funciones que ejercen estas células en el sistema olfatorio, en la década de los noventa el grupo de Ramón Cueto las propuso como candidatas a trasplante en lesiones de SNC, especialmente LM. Estos autores trasplantaron suspensiones de CGEO puras en un segmento de médula espinal rizotomizado, después de laminectomía en el nivel torácico inferior expusieron la médula espinal y seccionaron completamente una raíz dorsal (T10) en el punto de entrada a la médula. El muñón de la raíz se anastomosó quirúrgicamente al cordón y se trasplantaron las CGEO en la médula espinal en la zona de entrada de la raíz dorsal. Tres semanas después del trasplante se observaron numerosos axones de la raíz dorsal en regeneración que volvían a entrar a la médula espinal, en 1994 publicaron su primer trabajo en donde proponían que el trasplante de estas células en LM permitía la regeneración de axones en este medio ambiente hostil (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994). A partir de estas investigaciones, las CGEO han sido el centro de atención para muchos investigadores por su potencial reparador en determinadas patologías del SNC como por ejemplo las lesiones de la médula espinal y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994; Ramon-Cueto and Avila, 1998; Au and Roskams, 2003; Collazos-Castro et al., 2005; Feron et al., 2005; Mackay-Sim et al., 2008; Granger et al., 2012; Tabakow et al., 2013).

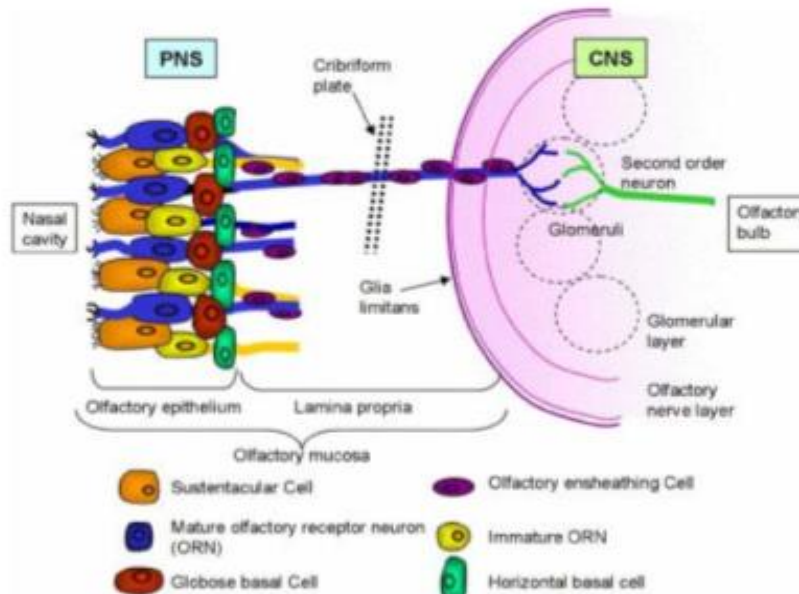


Figura 1-4. Representación de presencia de las CGEO en epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio principal (tomado de Fairless y Barnett, 2005).

El uso de CGEO de la MO no solo es ventajoso desde la perspectiva de la salud olfatoria del paciente ya que su obtención se hace por endoscopia a diferencia de las del bulbo olfatorio que requieren cirugía intracraneal con posible anosmia parcial o total luego del procedimiento (Rotenberg et al., 2011), sino que además existe la evidencia de que estas células pueden ser más beneficiosas para la aplicación de la terapéutica celular que su contraparte del bulbo olfatorio. Las CGEO han demostrado una mayor duración de la proliferación in vitro (Au and Roskams, 2003; Jani and Raisman, 2004), mayores niveles de secreción de factores neurotróficos (NGF, NT-3) in vivo (Huang et al., 2014), así como una mayor capacidad de migración, prevención de cavidades y crecimiento axonal en lesiones de médula espinal en modelos de ratas (Richter et al., 2005). Desafortunadamente, a pesar de estas características positivas, las CGEO siguen siendo difíciles de identificar en poblaciones de cultivos mixtos debido a la posible presencia de otros tipos de células, particularmente cuando derivan de la mucosa (Toft et al., 2012; Yao et al., 2018).

1.2.2 Origen de CGEO

En el epitelio olfatorio maduro existen dos tipos de células madre neurales, las células basales globosas (CBG) que son la principal fuente de neuronas y las células basales horizontales (CBH) normalmente quiescentes, pero que se activan generando nuevas CBG reconstituyendo la población del epitelio olfatorio luego de una lesión (Carter et al., 2004; Leung et al., 2007). El verdadero origen de las CGEO en la mucosa olfatoria adulta no está claro aún. Inicialmente se pensaba que la placoda olfatoria era la principal fuente de CGEO (Doucette, 1990; Ramon-Cueto and Avila, 1998) hoy en día se habla de un origen dual en donde participa en mayor medida la cresta neural (Forni et al., 2011; Katoh et al., 2011). En estudios que utilizan técnicas de mapeo de destino en pollo y rastreo de linaje genético en ratón, se sugiere que las CGEO son derivadas exclusivamente de la cresta neural y que comparten herencia común en su desarrollo con las células de Schwann, explicando así ciertas similitudes morfológicas y antigénicas entre las células de Schwann y las CGEO (Barraud et al., 2010; Forni and Wray, 2012).

Con base en su morfología, distribución topográfica, arquitectura del citoesqueleto y expresión antigénica y/o génica, varios estudios han informado que existen diferentes subpoblaciones de CGEO en el sistema olfatorio (Guerout et al., 2010; Windus et al., 2010). Se han descrito dos subpoblaciones basados en su morfología: las CGEO tipo Schwann (sCGEO) con morfología fusiforme bipolar presentando baja afinidad para el receptor de NGF y GFAP pero no expresan N-CAM y las CGEO tipo astrocito (aCGEO) con morfología estrellada planar que expresan el receptor de N-CAM y GFAP pero tiene baja expresión del receptor NGF (Franceschini and Barnett, 1996; Kumar et al., 2005). La existencia de estas subpoblaciones de CGEO se ha observado tanto in vitro como in vivo (Pixley, 1992). Se ha demostrado una elevada plasticidad morfológica de las CGEO mediante experimentos de microscopía en tiempo real al observarse transformación espontánea de un subtipo a otro (Huang et al., 2008). Es más, se ha indicado que su morfología podría ser fuertemente dependiente del medio de cultivo (Higginson and Barnett, 2011). Esto revela que las CGEO poseen fenotipo funcional altamente maleable. De hecho las sCGEO se ha demostrado pueden migrar tres veces más que las aCGEO (Huang et al., 2008) de manera que la morfología podría reflejar estados funcionales diferentes.

1.3 Modelos in vivo de lesión medular, regeneración, remielinización, recuperación funcional

Como se mencionó anteriormente, desde la década de los noventa se iniciaron los estudios de efectos in vivo de trasplante de CGEO en diversos modelos de LM. En 1994 el grupo de Ramón Cueto reportó en sus resultados, que luego del uso de CGEO en ratas con sección completa de las raíces dorsales de la médula espinal en C10 (vértebras cervicales 10) los animales presentaron recuperación funcional y crecimiento de axones de las raíces seccionadas (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994). Luego de este primer estudio Li y colaboradores en 1997 produjeron un modelo de lesión medular en rata, induciendo lesión electrolítica lateral a nivel C1C2 trasplantando CGEO del BO y concluyeron que producían regeneración funcional de axones adultos.(Li et al., 1997).

En 1998 Imaizumi y cols., indujeron en ratas desmielinización a nivel T10-T11 realizando trasplante de CGEO de BO no purificadas encontrando remielinización y recuperación electrofisiológica (Imaizumi et al., 1998). En los años 2000 usaron un modelo de sección de columna dorsal a nivel T11 concluyendo que las ratas sometidas al trasplante presentaron regeneración axonal, remielinización y recuperación electrofisiológica.(Imaizumi et al., 2000a; Imaizumi et al., 2000b).

Los trabajos de Richter y cols., 2.005 demostraron diferencias fundamentales en la migración y en el efecto regenerativo de la lesión dependiendo del tipo de célula utilizada, si es aislada del BO o de la lámina propia (LP) de ratas obteniendo mejor resultado con estas últimas (Richter et al., 2005).

En el año 2.007 Toft y cols., usaron marcadores retrógrados en ratas para constatar que el trasplante de CGEO promovía regeneración axonal en el lugar de la lesión y que el registro de potenciales evocados estimulando las raíces dorsales de L4-L5 fueron significativamente mayores que los obtenidos en el grupo control, observando una relación directa entre regeneración y recuperación motora (Toft et al., 2007).

Otros autores reportan resultados poco prometedores como Lu y cols., 2.006, quienes al comparar trasplante de células estromales de médula ósea vs CGEO en ratas concluyen que no hay diferencias en cuanto a regeneración axonal (Lu et al., 2006). Collazos y

Castro y cols., 2005 reportan que el trasplante no muestra ni regeneración del tracto corticoespinal ni mejora en los déficits locomotores en ratas con contusión medular cervical (Collazos-Castro et al., 2005). Sin embargo estos resultados contradictorios pueden atribuirse a variables como el modelo de lesión, la preparación de las CGEO y los procedimientos de trasplante, así como el criterio aplicado para la estimación de la regeneración axonal y las funciones motoras (Su and He., 2010). Es posible que la edad y cepa del tejido donador, la fuente del tejido y el método de preparación puedan influir en el resultado del experimento.

Las condiciones del cultivo in vitro de las CGEO pueden estar influyendo en la supervivencia de las células trasplantadas y en sus propiedades neuro protectoras y promotoras del crecimiento axonal y remielinización las cuales se podrían ver afectadas durante el cultivo pre-trasplante y los métodos de purificación. Novikova y cols., 2011, reportan que tiempos de cultivo de CGEO cortos (3 semanas), disminuyen esas propiedades que con tiempos de cultivo más largos (7 semanas). (Novikova et al., 2011).

Botero., 2015 evaluó el efecto del trasplante de CGEO y factor de crecimiento ácido de fibroblastos (aFGF) en un modelo de lesión medular completa en ratas en fase aguda y crónica de la lesión. Los animales trasplantados presentaron recuperación motora y sensitiva tanto en fase aguda como en fase crónica, mostrando puntajes variables en la escala motora BBB (entre 4 y 14) y mayor agarre en la rejilla, en comparación con las ratas de los grupos control las cuales no tuvieron recuperación funcional. La evaluación por microscopía confocal demostró que el trasplante indujo regeneración de axones en los segmentos craneal y caudal de la lesión, así como en el epicentro de la misma, donde se observaron axones regenerados atravesando la cavidad y uniendo los segmentos. El trasplante también disminuyó la cicatriz glial y el tamaño de los astrocitos reactivos. El análisis ultraestructural demostró la presencia de focos de remielinización en los animales trasplantados en las dos fases de la lesión. Estos focos de remielinización se caracterizaron por tener morfología compatible con mielina IV central y periférica. Estos resultados confirman el efecto positivo del trasplante de CGEO + aFGF en inducir recuperación en lesión medular y abren paso a nuevas etapas para su aplicación en terapia celular y reparación nerviosa (Botero., 2015).

Khankan y cols., 2016, en un modelo de transección completo de médula espinal en rata con trasplante de CGEO demostraron que el trasplante indujo atenuación del infiltrado de células inmunes, la reducción del daño secundario en los tejidos, la protección de neuronas y axones en el núcleo de la lesión y la ayuda en la eliminación de los residuos de mielina y sugirieron que las CGEO poseen mecanismos neuroprotectores e inmuno moduladores que crean un ambiente de apoyo para la supervivencia neuronal y la regeneración del axón después de la lesión de médula espinal y propusieron que estas cualidades permiten un uso terapéutico en LM (Khankan et al., 2016). Gu y cols., 2017 estudiaron el efecto del medio condicionado de las CGEO en un modelo de LM en rata y concluyeron que factores solubles producidos por estas células son los responsables de inducir regeneración axonal y la consecuente recuperación funcional (Gu et al., 2017).

1.4 Potencial regenerativo de las CGEO

Con el resultado positivo de los modelos in vivo muchos investigadores han desarrollado estudios para explicar los mecanismos por los cuales las CGEO estarían promoviendo los efectos benéficos en regeneración neuronal, axonal y en remielinización.

Factores solubles

La secreción de factores solubles es el principal mecanismo que explica los efectos del trasplante de las CGEO en la regeneración axonal. Las CGEO secretan neurotrofinas NT (3, 4, 5) y otros factores tróficos responsables de la extensión de neuritas en neuronas olfatorias in vitro (Kafitz and Greer, 1999). Las neurotrofinas cumplen un papel importante en el desarrollo neuronal, promoviendo la proliferación, supervivencia o excrecencia axonal (Huang and Reichardt, 2003) a través de sus receptores de tirosina quinasa específicos (Trks), que a su vez activan la señalización intracelular a través de proteínas G como Ras, Rap1 y Cdc42 (Huang and Reichardt, 2003). Las CGEO en cultivos expresan ARNm del factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), neurturina (NTN) y neuregulinas (Boruch et al., 2001; Pastrana et al., 2007), así como sus receptores TrkB, TrkC, GFRA-1 y GFRA-2 (Lipson et al., 2003). Adicionalmente la presencia intracelular y la secreción de NGF, BDNF (Pastrana et al., 2007) y neuregulina (Boruch et al., 2001) ha sido confirmado por inmunohistoquímica y ELISA.

Neuregulinas específicas, como las isoformas NGR-1, son factores tróficos para las células, actuando a través de los receptores ErbB, dado que las CGEO expresan ErbB2, 3 y 4 en cultivo (Moreno-Flores et al., 2003). Por lo tanto, las neuregulinas también pueden ejercer efectos autocrinos sobre estas células. Las CGEO también expresan otras moléculas que tienen efectos neurotróficos como S100b (Lipson et al., 2003) y que pueden cumplir funciones importantes en el desarrollo cerebral. De manera similar producen citoquinas que pueden jugar un papel relevante en neuroprotección y reparación incluyendo interleukina-6 (IL-6), (Roet and Verhaagen, 2014) y el factor de crecimiento transformante b3 (TGFb3) (Pastrana et al., 2006). Es importante destacar que las CGEO secretan proteasas que promueven la regeneración axonal como metaloproteasa de matriz 2 (MMP2), MMP9 y serpina1 (Simón et al., 2011). Se sabe que las CGEO secretan factores de crecimiento de fibroblastos ácido (FGFa) y básico (FGFb), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF) y factor inhibitorio de leucemia (LIF) involucrados en proliferación y diferenciación de precursores neuronales (Boruch et al., 2001; Lu et al., 2014).

Las CGEO producen además moléculas de la matriz extracelular (MME) como laminina, fibronectina, N-CAM y anosmina1 que son esenciales para el crecimiento axonal (Doucette, 1996). Se ha demostrado que la ausencia de estas moléculas inhibe la formación del tracto olfatorio lateral durante el desarrollo y la neurogénesis normal del EO (de Castro, 2009).

Las CGEO también expresan moléculas inhibitorias de la regeneración, aunque el significado de esto aún no se comprende bien. Las CGEO expresan Nogo y su receptor NgR (Woodhall et al., 2003; Nocentini et al., 2012) y este último tiene un efecto directo sobre la capacidad de las CGEO para migrar en mielina o sustratos que reciben mielina in vitro (Nocentini et al., 2012; Reginensi et al., 2015). De manera significativa este fenómeno puede afectar su capacidad para penetrar la cicatriz glial.

Neurogénesis y activación de células madre neuronales (CMN)

Las CMN son células multipotentes indiferenciadas que pueden autorenovarse y generar los tres tipos de células que constituyen el SNC (neuronas, AS y oligodendrocitos) y han sido identificadas en mamíferos adultos a lo largo del eje del SNC desde el prosencéfalo hasta la ME (Decimo et al., 2011), tienen marcadores de células madre como Musashi1,

Nestina y algunos miembros de la familia Sox (Decimo et al., 2011). Progenitores neurales fueron identificadas en áreas periventriculares de la ME y en otras regiones del parénquima, siendo capaces de diferenciarse in vitro a neuronas y células de glía. Además, se demostró que estas células podían identificarse en sustancia gris y blanca (Yamamoto et al., 2001). También se ha descrito un nicho de CMN en las meninges de la ME que se ha demostrado que participa activamente en la reacción parenquimal después de LM (Decimo et al., 2011). Se ha comprobado que, en lesión medular temprana muchas células ordinariamente quiescentes, ubicadas en la capa endodimial se transforman en precursores neuronales nestina+ y proliferan casi 15 veces su número comparado con la ME intacta (Xu et al., 2006).

Varios autores han demostrado que las CGEO pueden inducir proliferación y diferenciación de CMN a neuronas y a OL por medio de la producción de factor de crecimiento epidérmico (EGF), MME y otros factores neurotróficos (Chehrehasa et al., 2012). Por lo anterior se demuestra que en LM se induce la proliferación de CMN endógenas, probablemente por la producción de factores de crecimiento en el ambiente local, por lo tanto es factible que las terapias que permitan un microambiente que promueva la proliferación y diferenciación de progenitores neuronales endógenos se conviertan en una alternativa importante para pacientes que presentan LM.

Interacciones de las CGEO con la cicatriz glial.

Las CGEO interactúan con los astrocitos y con las células meníngeas y pueden mezclarse con los astrocitos en cultivo y en la cicatriz glial (Ramer et al., 2004; Moreno-Flores and Avila, 2006). En modelos in vitro de astrogliosis se ha comprobado la disminución de los astrocitos reactivos y la disminución de la expresión de GFAP al cocultivarlos con CGEO (O'Toole et al., 2007). La interacción CGEO astrocito implica un cambio en la cicatriz, un re-arreglo de sus procesos celulares para formar canales con moléculas inhibitorias del crecimiento en su superficie externa y desprovista de las mismas en la interna para que los axones pasen a través de ellos (Li et al., 2005). Este puede ser un evento crucial para el recrecimiento de axones dentro del área de la lesión luego de una LM. Las CGEO también producen proteasas de la matriz extracelular en paralelo con su capacidad para penetrar el tejido gliótico que se correlaciona con la regeneración del tracto corticoespinal (Pastrana et al., 2006). Además, se ha demostrado que las CGEO pueden reducir la reactividad astrocítica y la expresión de CSPG (García-

Alias et al., 2004; O'Toole et al., 2007). La capacidad de migración de las CGEO ha sido reportada en médula espinal intacta (Deng et al., 2006), siendo extensa en médula espinal y cerebro irradiados con RX (Lankford et al., 2014). Aunque inicialmente se describió la migración en LM (Ramon-Cueto and Avila, 1998), la capacidad de CGEO para migrar parece ser limitada o inexistente en varios modelos de LM dependiendo de los enfoques adoptados (Ramer et al., 2004; Andrews and Stelzner, 2007). Con respecto a los factores que ayudan a la migración de las CGEO, los astrocitos reactivos en la cicatriz glial las atraen en un modelo de LM de hemisección secretando TNF- α (Su et al., 2009). Además, el GDNF puede promover la migración de las CGEO in vivo e in vitro (Cao et al., 2006). La mayoría de los factores que inhiben el alargamiento y recrecimiento del axón después de la lesión también pueden afectar la migración de las CGEO (Reginensi et al., 2015). De hecho, todas las moléculas que se cree inhiben la migración de las CGEO (NogoA, CSPG, fibulina3 y Slit2) son sobre expresadas en las cicatrices del SNC después de la lesión (Vukovic et al., 2009; Reginensi et al., 2015).

Remielinización

Muchos estudios indican que CGEO son excelentes candidatas para terapias de remielinización tanto en LM como en modelos de enfermedades desmielinizantes (Imaizumi et al., 1998; Sandvig et al., 2012). Esta propiedad mielinizante puede ser directa a través de la producción de mielina por parte de las CGEO (Boyd et al., 2005) o indirecta por la inducción de la proliferación de los OL (Masgutova et al., 2010).

Se ha demostrado que las CGEO fetales son capaces de sintetizar mielina al igual que las CS in vitro (Devon and Doucette, 1992, 1995). Estos hallazgos fueron confirmados por Radtke y col., quienes observaron que las CGEO en cultivo tienen la capacidad de expresar CPNasa, un marcador de células formadoras de mielina, tanto en la membrana como en microtúbulos, concluyendo que estas células tienen la capacidad intrínseca de producir mielina (Radtke et al., 2011).

Kocsis y cols, demostraron el potencial mielinizante de las CGEO en un modelo de desmielinización en LM, aunque no pudieron diferenciar la acción mielinizante de las CGEO trasplantadas de los axones mielinizados por las CS del huésped (Kocsis et al., 2009). Se intentó resolver el dilema utilizando CGEO que expresaran constitutivamente proteína fluorescente verde (GFP) pudiendo verificar que aproximadamente la mitad de

los axones que mostraban mielina compacta estaban siendo mielinizados por células GFP positivas, confirmando la hipótesis de que las CGEO producen mielina in vivo, pero que había otras células del huésped que también remielinizaban axones (Sasaki et al., 2004). Estos y otros autores han propuesto que en la remielinización podrían participar además de las CGEO las CS del huésped que migran desde los nervios periféricos y llegan al sitio de la lesión (Boyd et al., 2005). La migración se haría por medio de la liberación de factores quimiotácticos para las CS por parte de las CGEO. En este sentido se ha confirmado la participación del receptor NGF que se une al receptor p75 expresado en estas células (Boyd et al., 2005). En los modelos de trasplantes con CGEO en LM la remielinización observada ha sido asociada a la proliferación de OL en el lugar de la lesión. Se sabe que en el cerebro y la ME después del nacimiento persisten los precursores de OL y que comparten características iguales a los OL en el desarrollo ontogénico, como la capacidad de diferenciarse a OL y AS y la expresión de marcadores NG2 y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (McTigue and Tripathi, 2008). Se ha propuesto que la proliferación de precursores de OL influye en la remielinización después de la LM (Jiang et al., 2008; Czepiel et al., 2015) de modo que la activación de este linaje glial después el trasplante de CGEO puede estar involucrada en parte en la remielinización junto con CS (Masgutova et al., 2010).

Regeneración axonal

En modelos animales de LM, las CGEO tienen la habilidad de promover el crecimiento, el rebrote y el ahorro axonal (Li et al., 1997; Lu et al., 2001; Garcia-Alias et al., 2004; Richter et al., 2005). En todos estos estudios se evaluaron los axones que volvían a crecer a partir de neuronas supraespinales o DRG y se identificaron mediante trazadores anterógrados y retrógrados transganglionares como, aglutinina, germen de trigo-peroxidasa de rábano picante, Dil, amida dextrana biotinilada o toxina del cólera subunidad beta (Li et al., 1997; Ramon-Cueto et al., 2000; Lu et al., 2001; Toft et al., 2007). Evidencia adicional de la regeneración de axones inducida por CGEO en y a través del sitio de la lesión proviene de estudios electrofisiológicos (Imaizumi et al., 2000a; Imaizumi et al., 2000b; Li et al., 2003; Toft et al., 2007).

Las CGEO actúan directamente como sustrato físico para el crecimiento de axones y neuritas, siendo esto más eficazmente promovido cuando las CGEO están en contacto con las neuronas, como se demostró in vitro (Chung et al., 2004) e in vivo (Li et al.,

2005). Las CGEO parecen ser capaces de extender los procesos citoplásmicos y generar estructuras en forma de canal a través de los bordes astrogliales de la lesión (Andrews and Stelzner, 2007) lo que sería útil para el crecimiento de axones en regeneración. Estos canales tienen una lámina basal externa superpuesta por fibroblastos y una superficie interna desnuda en contacto con las fibras nerviosas, lo que se postula como un determinante de su capacidad regenerativa formulada como la “hipótesis de la vía” (Li et al., 2005). De manera indirecta las CGEO tienen la habilidad de secretar factores neurotróficos que se relacionan con su capacidad regenerativa (Lipson et al., 2003; Sasaki et al., 2006). Su perfil secretor podría explicar la capacidad de los trasplantes de CGEO para facilitar la regeneración de algunos tractos espinales pero no de otros en el SNC lesionado dependiendo de sus requerimientos tróficos (Jones et al., 2001).

La proteína Scavenger clase B miembro 2 (SCARB2) que es producida por las CGEO parece ser clave en su capacidad para el crecimiento de neuritas (Roet et al., 2013; Roet and Verhaagen, 2014). Esta proteína media la captación y salida de colesterol de las células mediante la unión de alta afinidad de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Eckhardt et al., 2004) y que transporta beta glucocerebrosidasa (GBA) del retículo endoplásmico al lisosoma (Reczek et al., 2007). La expresión de SCARB2 se regula al alza en la capa de nervio olfatorio (ONL) inmediatamente después de una lesión y permanece alta durante el crecimiento interno de axones recién formados, la eliminación de SCARB2 en CGEO del BO disminuye el crecimiento de neuronas del DRG embrionarias cocultivadas y la sobre expresión de SCARB2 en fibroblastos de piel aumenta el crecimiento de neuritas en adultos (Roet et al., 2013). Aunque todavía es necesario determinar el modo de acción de esta proteína, considerando sus funciones conocidas, lo más probable es que esté relacionado con los mecanismos de transferencia de lípidos. Tales mecanismos son importantes para la biosíntesis rápida de la membrana de los axones durante la regeneración después de una lesión nerviosa (Boyles et al., 1989; Li et al., 2010). Las células gliales secretan lipoproteínas que contienen colesterol y pueden promover el crecimiento de neuritas y la formación de sinapsis en cultivos de células ganglionares de la retina y neuronas DRG (Handelmann et al., 1992; Mauch et al., 2001). La transferencia de lípidos y colesterol a los axones en crecimiento es importante para la síntesis de la membrana durante la regeneración después de una lesión (Li et al., 2010). Se sabe que el daño en el SNC conduce a la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos y el colesterol y que la

interferencia farmacológica o genética con la reutilización del colesterol frena el crecimiento axonal local (Roet and Verhaagen, 2014).

Estimulación de la angiogénesis

Varios estudios han informado un aumento en la angiogénesis in vivo después del trasplante CGEO de MO y de BO (López-Vales et al., 2004; Richter et al., 2005). Se identificaron 55 genes que se han relacionado con el desarrollo de vasos sanguíneos y que están regulados diferencialmente en CGEO de BO en (mayor o igual) 3 conjuntos de datos de microarrays (Roet et al., 2011). SMAD7 se identificó como un gen en la red de interacción molecular de desarrollo de vasos sanguíneos y estaba directamente conectado funcionalmente a otros 8 genes en esta red, siendo también de particular interés los genes ESM1, CYR61, ANGPT2. El gen ESM1 media la angiogénesis inducida por el VEGF-A (Roudnicky et al., 2013) y CYR61, es una proteína secretada y un potente estimulador de la angiogénesis que actúa directamente sobre las células endoteliales (Brigstock, 2002). ANGPT2 promueve la neovascularización (Asahara et al., 1998) y se ha informado una mayor expresión de ANGPT2 en células positivas para GFAP y NG2 después de una lesión de médula espinal y estos niveles de expresión se correlacionan positivamente con una función locomotora mejorada (Durham-Lee et al., 2012).

1.5 Estudios clínicos en humanos y caninos

Con respaldo en todos los estudios de modelos animales y trasplante de CGEO y el efecto beneficioso en relación con mejoría funcional, muchos grupos iniciaron pruebas clínicas con trasplante en seres humanos con diversos resultados.

En Australia en el año 2005 se realizó un ensayo clínico fase I, que logró demostrar la viabilidad y seguridad del trasplante autólogo de CGEO en la médula espinal lesionada en caso de paraplejía humana, y que concluyó que es factible y seguro, y que no inducía efectos adversos a los 12 meses post trasplante. (Feron et al., 2005).

Mackay-Sim y cols, 2008, evaluaron pacientes sometidos a trasplante con CGEO que presentaron paraplejía torácica completa (con dos años antes del trasplante) durante un período de tres años después del trasplante. No hubo hallazgos adversos 3 años después del trasplante autólogo de CGEO. Las imágenes de resonancia magnética (IRM)

a los 3 años no mostraron cambios desde las IRM preoperatorias o las IMR intermedias a 1 y 2 años, sin evidencia de tumor ni siringomielia postraumática u otros hallazgos radiológicos adversos. Llegando a la conclusión de que el trasplante de CGEO es factible y seguro hasta 3 años después de la implantación (Mackay-Sim et al., 2008).

Tabakow y cols, 2013, trasplantaron CGEO autólogas obtenidas de MO en pacientes humanos con LM completa y realizaron evaluación mediante pruebas clínicas neurofisiológicas y radiológicas que mostraron una mejoría en la transmisión de la médula espinal y la actividad de los músculos de las extremidades inferiores y restitución de la continuidad de algunos tractos de la sustancia blanca a lo largo del foco de la lesión de la médula espinal (Tabakow et al., 2013).

Observaciones clínicas a un año confirman que la obtención, cultivo y trasplante intraespinal de células autólogas CGEO en pacientes humanos es seguro. Entre los posibles mecanismos para el mejoramiento funcional se sugiere que en el trasplante de las CGEO pueden mediar en alguna restitución de vías aferentes y eferentes en la sustancia blanca medular de estos tres pacientes. (Tabakow et al., 2013).

Por lo anterior consideramos importante realizar estudios clínicos en pacientes caninos cuya lesión medular no sea producida de manera experimental, ya que el resultado puede variar debido en parte a que las lesiones clínicas difieren mucho en tamaño y patogénesis de las lesiones experimentales en roedores., por lo que consideramos que los resultados de este estudio pueden llegar a tener importantes implicaciones para futuros ensayos clínicos sobre trasplante de CGEO en humanos, debido a que proporcionará una mayor comprensión de las capacidades de respuesta de la médula espinal lesionada.

En el caso de pacientes animales, y específicamente de los caninos se sabe que lesión de la médula espinal es un problema clínico común, que guarda ciertas similitudes con el proceso que se produce en seres humanos (Fluehmann et al., 2006).

Desde 2005 se empezaron a reportar pruebas de trasplante en pacientes caninos con LM. Jeffery y cols, 2005, concluyeron que el trasplante autólogo de CGEO obtenido del bulbo olfatorio (BO) en caninos es confiable y seguro y que además ha producido efectos

benéficos bien definidos como mejoría en los puntajes de la escala BBB, incremento en los movimientos de paso de miembros pélvicos en caninos con LM de ocurrencia natural.(Jeffery et al., 2005).

En los perros la lámina propia está especialmente bien desarrollada en la mucosa olfatoria (MO) de la parte posterior del tabique nasal, cerca de la placa cribiforme del hueso etmoides y por lo tanto es el área más favorable para cosechar las CGEO. Debido a que existen diferentes estructuras que constituyen la MO y al papel desconocido que estas podrían desempeñar en el trasplante, se ha sugerido que al tomar muestras, se debe incluir la mucosa olfatoria completa.

En 2012 Granger y cols., propusieron un primer trabajo de medicina translacional, en el cual querían probar trasplantes celulares que ya habían tenido efecto positivo en modelos animales de lesión medular en roedores. Por ello trasplantaron CGEO obtenidas de mucosa olfatoria (MO) por acceso quirúrgico al seno frontal izquierdo, en lesiones medulares crónicas de caninos en grado equivalente a Asia grado "A" en humanos. Se realizaron medidas de análisis de marcha, potenciales evocados sensitivos, potenciales evocados motores magnéticos transcraneales. Ellos resaltan finalmente que el trasplante puede mediar un cambio sustancial en la función motora en los pacientes trasplantados, pero que el efecto parece estar localizado más bien en un circuito intraespinal, más que en la recuperación de tractos largos y por ello sugieren que el trasplante debe estar acompañado de otras intervenciones terapéuticas (Granger et al., 2012).

2. Materiales y métodos

2.1 Búsqueda y clasificación de sujetos (animales experimentales)

La muestra de caninos utilizada en este estudio fue obtenida de manera aleatoria de la siguiente forma: inicialmente se hizo la convocatoria a través de las redes sociales, durante los meses de marzo a septiembre de 2019. Dicha publicación fue compartida con grupos de fundaciones, sociedades de protección animal y Médicos Veterinarios de la ciudad de Bogotá, de manera que la muestra resultante fuera representativa de la población de caninos de la ciudad de Bogotá.

2.1.1 Criterios de Inclusión

Para la selección de los pacientes se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

1. Caninos machos o hembras de cualquier edad.
2. Que presentaran lesión medular crónica por trauma de la médula espinal situada entre la zona torácica o lumbar.
3. Que no tuvieran patología de base diferente y no estuvieran recibiendo medicación permanente.
4. Que no presentaran enfermedad generalizada
5. Que estuvieran libres de patologías ortopédicas que impidieran la evaluación precisa del aparato locomotor.
6. Que no tuvieran comportamiento agresivo.

Cuando los pacientes caninos fueron seleccionados, se informó a los propietarios en detalle sobre los procedimientos a realizar, los riesgos que corrían los sujetos del estudio durante los mismos y la posibilidad de que los resultados pudieran ser diversos: desde

negativos hasta resultados positivos en sensibilidad y actividad motora. Todos los propietarios firmaron el consentimiento informado (Anexo 1).

2.2 Toma de muestra de mucosa nasal para cultivo celular primario

La toma de muestra nasal para cultivo primario se hizo momentos antes al procedimiento de toma de resonancia magnética pre-trasplante para aprovechar el momento anestésico.

Estos dos procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones de CREVET (Centro de Resonancia Especializada Veterinaria) en la ciudad de Bogotá. Los individuos se dividieron en tres grupos para realizar los procedimientos en tres días, (toma de muestra y toma de primera resonancia). Los sujetos se recibieron el día y la hora señalados previamente acordados entre el investigador, los funcionarios de CREVET y los propietarios. Los animales asistieron en ayunas y los dueños presentaron los exámenes prequirúrgicos exigidos por la institución CREVET (CH, ALT, BUN, Creatinina, parcial de orina). El investigador presentó diligenciado el registro de ingreso individual a CREVET (Anexo 2), con el fin de cumplir los requisitos exigidos por la institución para la toma de resonancia y para determinar la región anatómica exacta de la columna a evaluar. Para las intervenciones programadas: a) toma de la muestra de mucosa nasal y b) toma de resonancia columna vertebral, los pacientes se sometieron al siguiente protocolo anestésico: Premedicación con fentanilo 3 microgramos/kg (IV), midazolam 0.2 mg/kg (IV), inducción anestésica con Propofol 3 mg/kg (IV) y mantenimiento anestésico con Isoflurano al 1-2% a efecto.

2.2.1 Toma de la muestra de mucosa nasal

Para la toma de las muestras de mucosa nasal, se utilizó un endoscopio Karl Storz para aves con óptica de visión foroblicua HOPKINS 30° 2,7 m.m de diámetro, longitud 18 cm, esterilizable en autoclave, con conductor de luz de fibra óptica incorporado, color distintivo rojo. Vaina de exploración, 14.5 Charr., longitud útil 15 cm con canales de trabajo 5 Charr, y 2 llaves, incluye obturador romo 67065 CO, pinzas para biopsia, flexibles ovales, abertura bilateral, 5 Charr., longitud 34 cm y Smart scope adaptador de endoscopio para teléfono celular Galaxy S6 para visualización (Fig. 2-1).

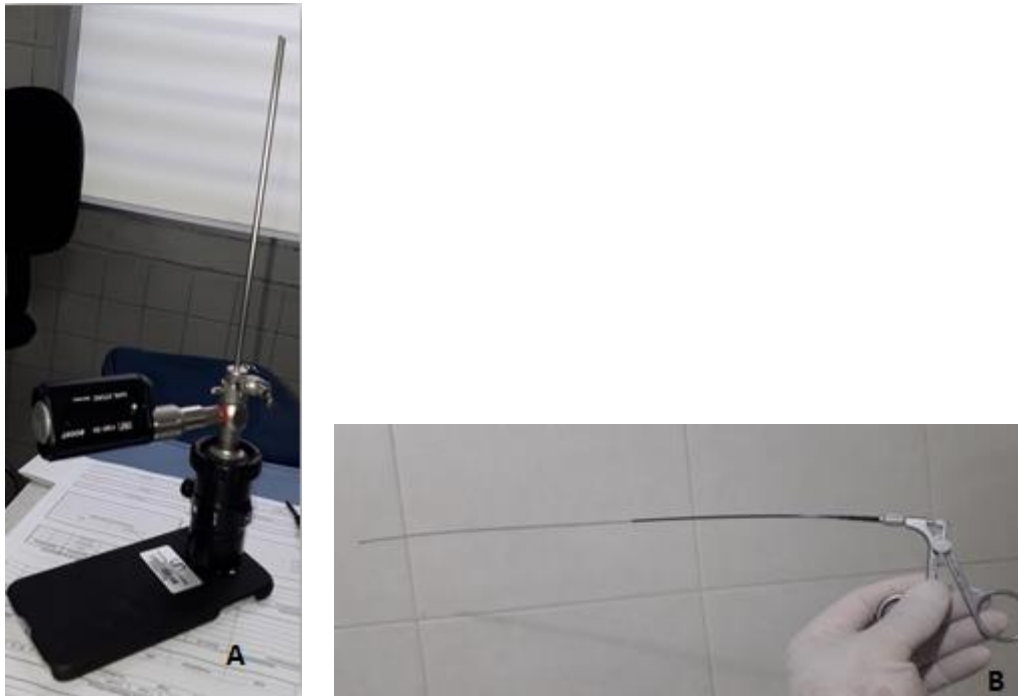


Figura 2-1. A) Endoscopio Karl Storz para aves utilizado en la endoscopia de la cavidad nasal de los caninos. B) Pinza para la toma de la muestra de mucosa nasal.

En todos los casos los caninos se posicionaron en decúbito esternal, y se ubicó la vaina del endoscopio en la entrada de la fosa nasal con dirección ligeramente medial con el objetivo de salvar el obstáculo del cartílago alar y conseguir introducir el equipo sin lastimar el animal. En seguida el equipo se enderezó y una vez dentro, se avanzó lentamente hacia caudal observando cambio de color en la mucosa pasando de rosado pálido en la mucosa respiratoria a café en la mucosa olfatoria en la parte posterior de la cavidad nasal como se ilustra en las figuras 2-2 y 2-3 (Craven et al., 2007).

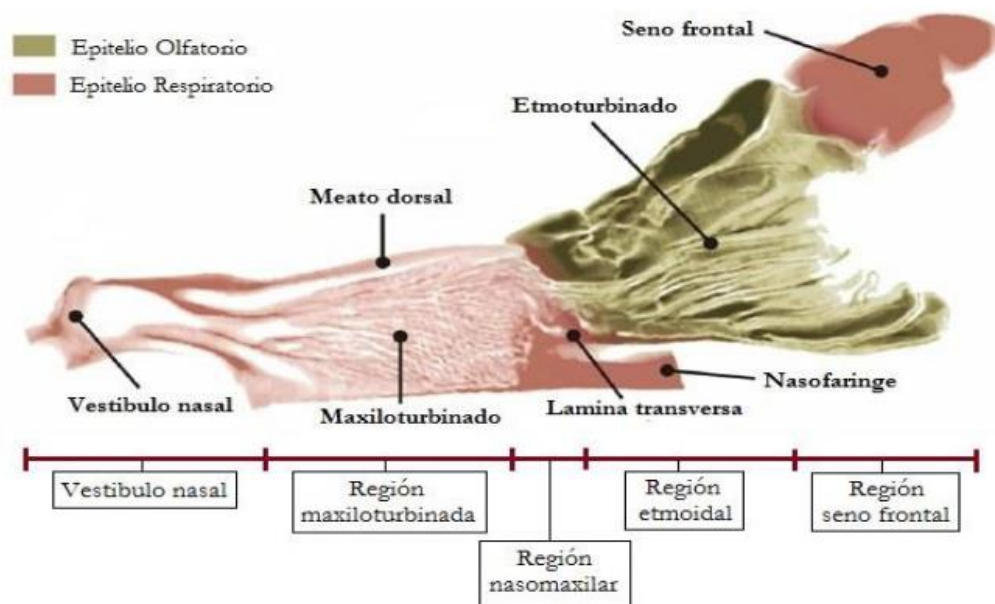


Figura 2-2. Distribución del epitelio respiratorio y epitelio olfatorio en la cavidad nasal canina (Craven et al.,2007).

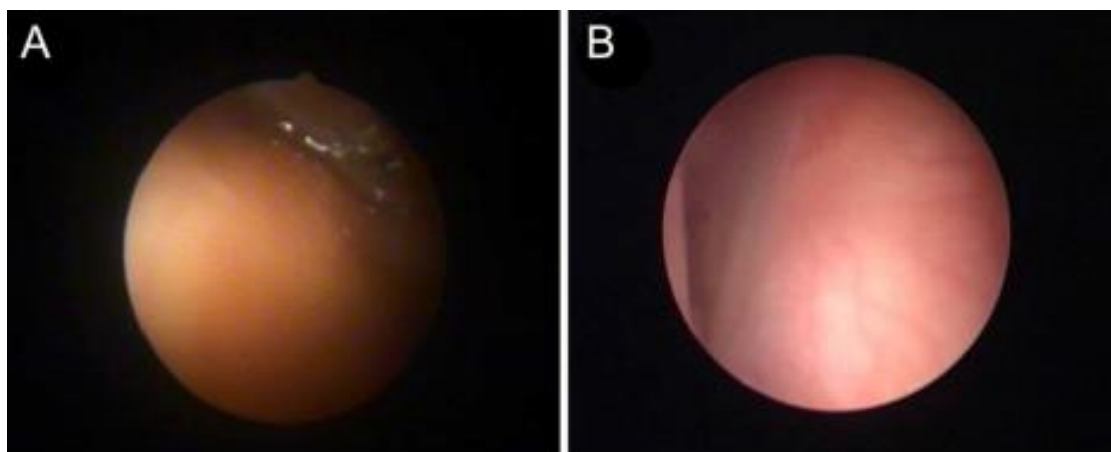


Figura 2-3. A) Mucosa olfatoria de color café. B) Mucosa respiratoria de color rosado. (Cifuentes J.M. P. Fernández de Trocóniz, 2011).

Una vez alcanzado esta área de toma, se procedió a empujar la pinza de biopsia, ya montada en el equipo para tomar la muestra en la región medial del campo visualizado. Para la toma se empujó levemente la pinza para realizar contacto con el tejido blanco en la cara medial de la mucosa, y se cerró la misma para obtener la muestra, la cual se depositó en tubos falcon estériles conteniendo 10 ml de PBS con antibiótico y

antimicótico al 1%, para ser transportada rápidamente refrigerada al Laboratorio de cultivo celular para su inmediato procesamiento (Fig. 2-4).

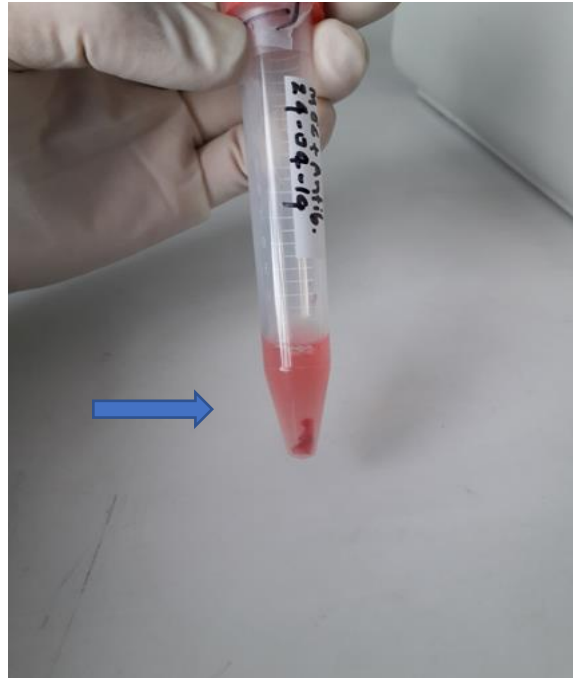


Figura 2-4. Embalaje de la muestra para procesamiento en el laboratorio de cultivos celulares. Señalada con flecha azul el tejido de mucosa olfatoria conservado en 10 ml PBS con antibiótico antimicótico al 1%.

Se procedió de la misma manera en la otra fosa nasal para obtener una segunda muestra. En la mayoría de las tomas efectuadas se produjo un leve sangrado el cual se manejó taponando la fosa con gasa estéril con leve presión durante tres minutos. Una vez tomadas las muestras de mucosa nasal, los profesionales de CREVET condujeron a los pacientes al resonador para ser posicionados para iniciar la toma de resonancia en la región específica de la columna vertebral determinada previamente. Se administró meloxicam 0.2 mg por kilo el primer día (Sbc), dejando medicación para la casa de 0.1 mg por kilo cada 24 horas vía oral por dos días más para manejar dolor e inflamación por la toma de la muestra.

2.2.2 Cultivo primario de células de la glía envolvente olfatoria (CGEO)

Para la obtención de las células se utilizó un protocolo basado en varias publicaciones sobre el tema, con algunas modificaciones (Botero., 2015). Las muestras de mucosa nasal de cada uno de los sujetos del estudio se procesaron de manera individual. Las muestras llegaron al laboratorio en refrigeración y se colocaron en cajas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro debidamente esterilizadas para proceder a su procesamiento (Fig 2-5). En primer lugar, se cortaron de manera muy fina con hojas de bisturí N°11 y se pasaron a tubos falcon de 10 ml con 2 ml de medio de crecimiento (MC) compuesto por DMEM/F-12, Gibco 11320033), 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco 16170086), 1% glutamina, 1% de antibiótico antimicótico (Gibco), para ser centrifugados a 1.000 rpm por 10 minutos a 20 °C.

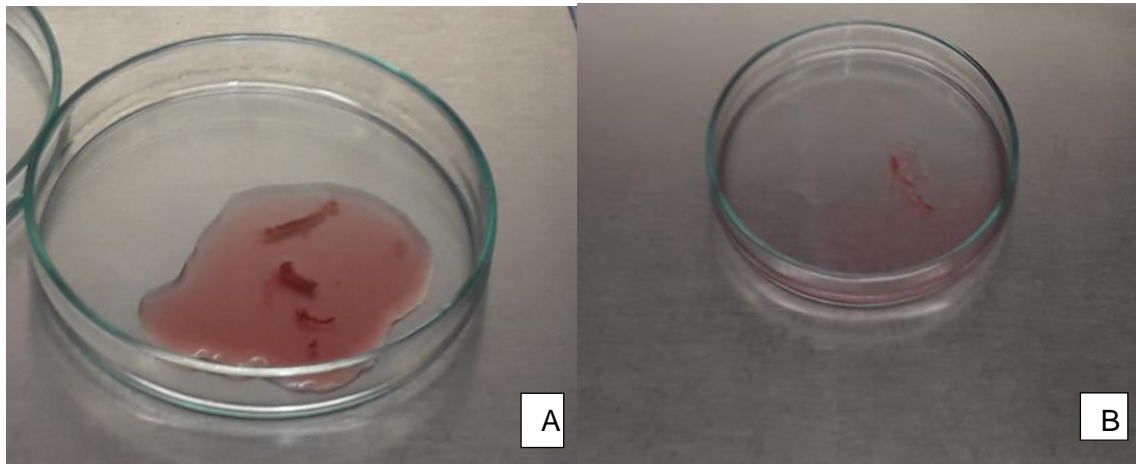


Figura 2-5. Muestra de mucosa recepcionada en laboratorio de cultivos celulares. A) Antes de corte. B) La misma muestra luego del procedimiento de corte.

Acto seguido se aspiró el sobrenadante y se adicionaron 3 ml de MC disgregando el botón celular, nuevamente se centrifugó a 1.000 rpm por 10 minutos y se aspiró el sobrenadante, quedando visible el botón celular al que se le agregó tripsina (Sigma-Aldrich T1426) al 1% en PBS y se incubó por 20 min a 37 °C con 5% de CO₂, para seguidamente centrifugar a 1.000 rpm por 10 min, cuando se aspiró sobrenadante para agregar 2 ml de MC y centrifugar nuevamente a 1.000 rpm por 10 min. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se re suspendió el pellet en 2 ml de MC, mezclando con pipeta para obtener una suspensión celular, la cual se sembró en cajas Petri de 6 pozos sin Poly-L Lysina, en el pozo # 1, y se llevó a incubación a 37 °C con 5% de CO₂ por 18 horas. Pasado ese tiempo se aspiró el sobrenadante del pozo N°1, se sembró en el

siguiente pozo N°2 y se incubó por 36 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Por último, el sobrenadante del pozo 2 se aspiró y se sembró el pozo N°3 previamente recubierto con Poli-L-Lisina (Sigma P4707). Después de este último paso se dejó el cultivo en incubación bajo los mismos parámetros durante 48 horas, tiempo en el cual se cambió el medio y se continuó con cambios de medio cada 48 horas durante 20 días.

Antes de realizar los cultivos en los pacientes se hicieron pruebas piloto con mucosa olfatoria obtenida de cadáveres, luego de caninos sanos y cuando estuvo estandarizado el cultivo (adicionando al MC 2 micromoles de forskolina Sigma) entonces se iniciaron las tomas en los pacientes reclutados.

2.3 Toma de resonancia magnética de columna vertebral

Para este examen se utilizó un resonador de marca Esaote Vet MR grande, equipo especialmente diseñado para uso veterinario que combina hardware y software para estudios de sistema nervioso central y periférico. Previa anestesia descrita en el numeral 2.2 (Toma de muestras nasales), se posicionaron los caninos en decúbito lateral derecho y se realizaron las imágenes ponderándose la región con cortes de 4 mm de espesor con gap=0.5 en planos transversal, dorsal y sagital. Se efectuó exploración utilizándose secuencias T1, T2 y T1 con gadolinio y flair (Fig. 2-6). Estos procedimientos duraron entre una o dos horas, posterior a esto los sujetos pasaron a sala de recuperación para ser entregados luego a sus propietarios.



Figura 2-6. Resonador Esaote Vet MR grande. Posicionamiento del sujeto para toma de resonancia magnética, el paciente debe estar bajo anestesia general con monitoreo de parámetros fisiológicos por una hora o dos.

Con el mismo protocolo mencionado se tomó una segunda resonancia de control a los tres meses post trasplante en todos los sujetos.

2.4 Prueba piloto para la introducción y ubicación de agujas espinales para trasplante

Para el procedimiento de trasplante se utilizó la metodología de inyección percutánea con aguja guiada con ecografía, y para poner a punto la técnica se realizó una prueba piloto para asegurar que el método y las agujas propuestas fueran las adecuadas y no causaran daño. Para ello se dispuso de una pieza anatómica de la región espinal toracolumbar de un canino de tamaño grande, procedente del laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. La pieza se depiló y se posicionó en decúbito esternal para hacer seguimiento ecográfico como medio de imagen guía. El ecógrafo utilizado fue un Logiq V5-General electric. transductor microconvex 8C-RS de 8 a 10 MHz, cuya profundidad máxima fue de 1.8 cm. Se escogió el área específica (L1-L2) en donde se aplicó el gel conductor de ultrasonido; se visualizaron las apófisis espinosas y articulares de las vértebras lumbares y se ubicó una aguja espinal punta tipo quincke (22G x 3.50IN 0.7 mm x 90mm) en posición perpendicular con respecto a la columna vertebral ligeramente lateral a la línea media entre las vértebras L1-L2 con el bisel apuntando hacia craneal. La aguja penetró piel, tejido subcutáneo y musculatura vertebral, se observó el avance de la aguja en los tejidos, se sintió el contacto de la punta con la lámina vertebral, en esta ubicación por la profundidad en los tejidos no se visualiza la aguja en el monitor del ecógrafo, esta se fue inclinando del extremo distal caudalmente para avanzar el bisel cranealmente buscando el espacio intervertebral, al llegar a esa ubicación se empujó suavemente la aguja y se sintió como atravesó el ligamento intervertebral para finalmente penetrar en la médula espinal en donde se percibió la suavidad del cambio de tejido. Se siguieron esos mismos pasos en los espacios, L1-L2, L3-L4, L4-L5, L6-L7. Una vez posicionadas las agujas en dichos espacios se tomó placa de rayos X para verificar la ubicación de las agujas en la médula espinal (Fig. 2-7).

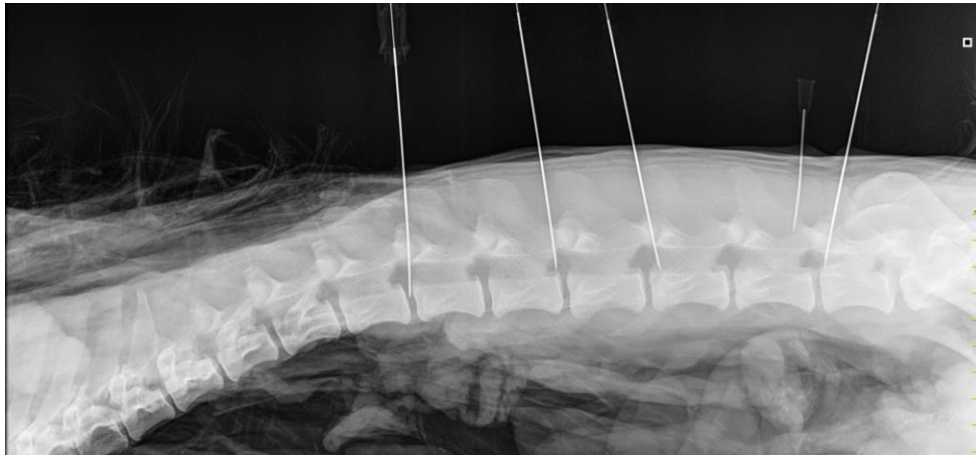


Figura 2-7. RX Vista latero lateral de la pieza anatómica canina que permite observar la ubicación de las agujas espinales del piloto dentro de la médula espinal. Se observa que llegan al tejido medular en espacios L1-L2, L3-L4, L4-L5, L6-L7.

Cada uno de los pacientes reclutados recibieron trasplante autólogo del cultivo primario de CGEO. Para cada uno de los pacientes las células a trasplantar que se cultivaron después del paso tres durante 20 días, reposaban en cajas de petri bajo incubación. Así el trasplante se preparó minutos antes de la intervención para la inyección de las células. Para ello se aspiró el sobrenadante de cada pozo y se agregaron 500 microlitros de tripsina (Sigma-Aldrich T1426) al 1 % incubando por 10 minutos a 37 °C con 5% CO₂, se agregaron 2 ml de MC, para así recoger las células en tubos falcon de 10 ml y centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos. Por último, se aspiró el sobrenadante y se disolvió el botón celular en 0.4 ml de medio para el trasplante (MT) constituido por (DMEM/F-12, Gibco 11320033), 1% de antibiótico antimicótico (Gibco 15240062), 1% de Glutamina (Sigma-Aldrich G3126). Los trasplantes se colocaron en tubos Ependorf para ser trasladados inmediatamente a la sala de cirugía.

2.5 Intervención para procedimiento de trasplante medular de cultivo primario de CGEO

Las intervenciones de trasplante medular se llevaron a cabo en los quirófanos de la Clínica para Pequeños Animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Para el día del procedimiento a todos los pacientes se les realizaron exámenes prequirúrgicos (Ch, ALT, BUN, creatinina, parcial de orina) y se prepararon para el trasplante celular. Los caninos se premedicaron con

atropina 0.022 mg/kg, ketamina 1.5 mg/kg, y fentanil 5 microgramos/kg (IV) y se hizo Inducción con propofol a dosis de 3 mg/kg I.V. y la anestesia se mantuvo con isoflurano al 2-3% inhalado y bolos de propofol IV a dosis de 1 mg/kg.

Los pacientes se colocaron en decúbito esternal para hacer la desinfección del área quirúrgica. El cirujano ubicó el espacio anatómico determinado previamente ayudándose manualmente palpando las apófisis espinosas vertebrales y una vez asegurado el sitio se depositó el gel para ecografía en la piel del área a trabajar, acto seguido se ubicó la sonda del ecógrafo para con esta guía ecográfica visualizar los tejidos, las apófisis espinosas de las vértebras y ubicar de manera efectiva el sitio de la lesión para proceder a introducir la aguja espinal y hacer el trasplante (Fig. 2.8). A continuación, se ubicó la aguja perpendicular al cuerpo del sujeto muy cerca de la línea media en el área precisa con el bisel hacia craneal, se atravesó la piel, el tejido subcutáneo y los músculos espinales buscando el espacio intervertebral, al realizar movimientos leves de la aguja hacia arriba y hacia abajo se pudo visualizar la punta de la aguja en el monitor del equipo. En el momento en que se siente que la aguja perfora el ligamento intervertebral y entra a un tejido que ofrece muy poca resistencia es cuando se determinó que la aguja llegaba al interior de la médula espinal. Por último, se empató la jeringa que contenía el trasplante para ir introduciendo la mitad de su contenido avanzando el émbolo muy lentamente, se tomaron tres minutos, posteriormente se extrae cuidadosamente la aguja de los tejidos 1 o 2 m.m. para nuevamente introducir la otra mitad del contenido de la jeringa un poco más arriba en el tejido medular. Luego se desempató la jeringa y se introdujo la sonda para introducir las células que han quedado en la longitud de la misma introduciendo de esta manera la totalidad de las células. Al final se retiró suavemente la aguja y se realizó presión con apósito estéril en el área de la punción por 3 minutos para mantener los tejidos comprimidos y evitar la salida de las células de su sitio de trasplante.

Cuidados postoperatorios

Después del procedimiento de trasplante los caninos pasaron a sala de recuperación donde se monitorearon durante dos a tres horas. Posteriormente se entregaron a sus propietarios y se dejó medicación con meloxicam oral a dosis de 0.1 mg/kg cada 24 horas por tres días y cefalexina a dosis de 20 mg/kg vía oral cada 8 horas por 5 días. Se

les recomendó a todos los propietarios evitar que los animales hicieran movimientos bruscos y que tuvieran caídas o golpes, adicionalmente continuar con la dieta que normalmente llevaban.

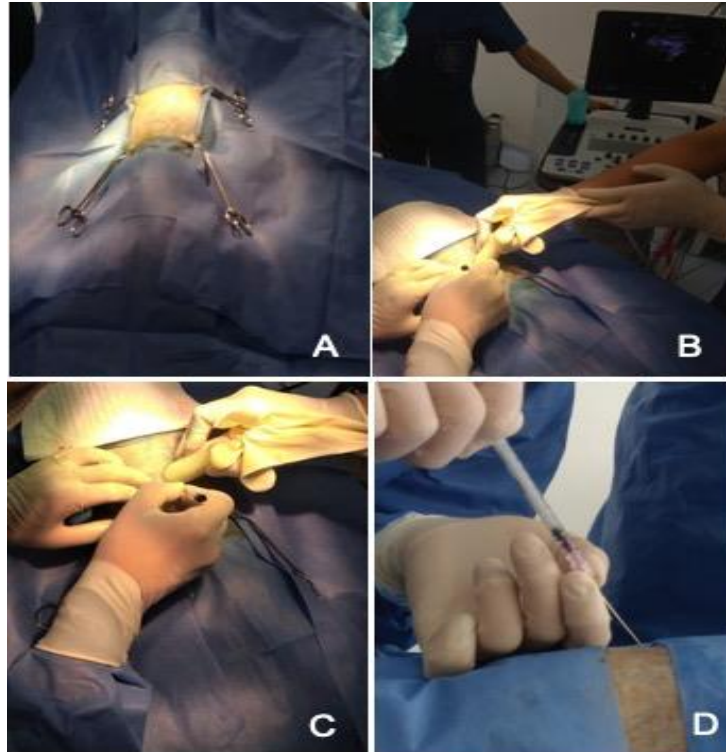


Figura 2-8. Preparación de los pacientes para el trasplante. A) Colocación de campos. B) Aplicación de gel y colocación de la sonda ecográfica. C) Introducción de la aguja espinal. D) Inyección de las células.

2.6 Evaluación funcional

Estas pruebas se realizaron en varios momentos del estudio, uno primero pre quirúrgico, en donde los caninos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron sometidos a examen neurológico general y a evaluación de la marcha y tres adicionales mensuales post trasplante que se realizaron durante tres meses.

2.6.1 Examen neurológico

Examen neurológico general

Con este examen se busca determinar el estado neurológico del paciente y si se encuentran alteraciones, permite sospechar el sitio lesionado.

- Estado mental: se evaluó la condición de depresión, estupor o coma.

- Postura: posición de la cabeza, posición y conformación de la columna vertebral, posición de base de sustentación, apoyo con los nudillos, imposibilidad para mantenerse en estación.
- Marcha: paresias, plejía, ataxia (propioceptiva, vestibular o cerebelar).
- Reacciones posturales y propiocepción general.
- Sensibilidad superficial y profunda.
- Dermatómeros.
- Reflejos espinales miembros posteriores.
- Otros reflejos.

Reacciones posturales y propiocepción general

1) Reacciones de colocación visual y táctil

Ejecución: se levanta el paciente hasta la altura de la mesa dejando libres los miembros pélvicos y se le acerca al borde a la altura de los tarsos.,

Respuesta: lo normal es la acomodación de los miembros (o la intención de hacerlo) sobre la mesa, antes de establecer contacto con ella, o una vez establecido el contacto.

2) Prueba de nudillos

Ejecución: se coloca el dorso de las falanges del animal en contacto con el suelo, mientras se le obliga a apoyar el peso sobre la extremidad, para lo cual puede sujetarse con la otra mano por el tórax o el abdomen.

Respuesta: un individuo normal colocará inmediatamente la extremidad en su posición inicial.

3) Prueba de la carretilla

Ejecución: se obliga al animal a caminar en línea recta apoyándose en miembros pélvicos para lo cual se lo levanta de las extremidades anteriores.

Respuesta: el animal se mueve hacia adelante con los miembros pélvicos como si caminase normalmente.

4) Prueba del salto sobre una extremidad

Ejecución: se sostiene al animal de modo que apoye el peso en una sola extremidad y se lo hace andar lateralmente sobre una línea recta imaginaria perpendicular a la columna vertebral

Respuesta: un individuo sano avanzará la extremidad rápidamente hasta el lado hacia el que se mueve, realizando saltos pequeños y de amplitud similar para colocarla en posición de máximo apoyo y perpendicular al suelo.

5) Estancia y marcha en bípedo lateral

Ejecución: se levantan los miembros torácico y pélvico del mismo lado para que recaiga el peso sobre los del lado contrario. En esta posición se obliga al paciente a caminar lateralmente hacia el lado en el que se apoya.

Respuesta: en respuesta a un movimiento lateral del cuerpo el animal realiza saltos pequeños y alternativos con los dos miembros que están apoyados a fin de mantenerse en equilibrio.

6) Extensor postural

Ejecución: se sostiene al animal por las axilas, se lo levanta y se lo hace descender suavemente hasta que los miembros pélvicos tocan el suelo.

Respuesta: durante la fase de elevación el animal mantiene los miembros pélvicos extendidos. Al advertir que está descendiendo aumenta la extensión para prepararse al contacto con el suelo. Al tocar el suelo alcanzan el grado máximo de extensión y el paciente da algunos pasos hacia atrás.

7) Reacción tónica del cuello

Ejecución: con el paciente en estación, se lo sujeta con una mano por el hocico y se coloca la otra en la parte posterior del cuello. En esta posición se procede a extender el cuello.

Respuesta: la reacción del animal consiste en una ligera extensión de los miembros torácicos y una ligera flexión de los miembros pélvicos.

De acuerdo a la respuesta se calificaron como sigue: 0 si no hay respuesta, 1 respuesta leve, 2 respuesta normal.

2.6.2 Pruebas de sensibilidad somática general (prueba de la sensibilidad o de la percepción dolorosa).

Comprende aferencias de la dermis, músculos, tendones, articulaciones y periostio.

La estimulación de los receptores cutáneos permite evaluar la sensibilidad superficial (dolor punzante localizado), que se distingue de la sensibilidad profunda (dolor sordo poco localizado), la cual se valora activando receptores presentes en el periostio, cápsulas articulares, músculos y tendones). Se debe pellizcar la piel con una pinza hemostática sin dientes comenzando por una presión leve y aumentándola hasta obtener respuesta.

Dermatómeros miembro pélvico:

- Safeno: se estimula la piel en el dedo más medial.
- Peróneo: se estimula la piel en la cara dorsal del miembro.
- Tibial: se estimula la superficie plantar.

Respuesta: sólo la respuesta de comportamiento indica que el estímulo ha llegado a la corteza cerebral, ha sido percibido como doloroso y se ha elaborado una reacción, como puede ser volver la cabeza hacia la zona de aplicación del estímulo, intentar morder o gruñir. En casos muy particulares caracterizados por un compromiso general muy grave que implica imposibilidad de moverse, el único signo de dolor puede ser una dilatación transitoria pupilar por activación del sistema nervioso simpático. Retraer la extremidad como única respuesta no es un signo de percepción consciente de dolor, solo significa que la estimulación periférica ha activado el arco reflejo responsable del reflejo flexor.

Las anteriores pruebas se valoran en una escala como sigue:

Ausente.....0
Disminuído.....1
Normal.....2

2.6.3 Reflejos espinales

Se evaluaron aquellos destinados a la función de las extremidades posteriores. Evaluando la integridad del arco reflejo y de la MNS que influye sobre ellos.

Reflejos evocables del miembro pélvico:

1-Flexor. Ejecución: se evoca estimulando la piel del dedo más medial (N. safeno), la superficie dorsal de los otros dedos (N. peróneo), o la superficie plantar (N. tibial).

Centro de integración: segmentos L6-L7 y marginalmente S2.

Vía eferente: alfa motoneuronas recorriendo el nervio ciático que inerva flexores del miembro pélvico (bíceps femoral, semimembranoso, semitendinoso, tibial craneal, flexor superficial, flexor profundo de los dedos).

Respuesta: flexión de todas las articulaciones del miembro pélvico.

2-Patelar. Ejecución: se soporta el peso de la extremidad por su cara medial para mantener ambas extremidades paralelas sin que se toquen, evitando efectuar presión en el músculo cuádriceps femoral y manteniendo la articulación de la rodilla flexionada con un ángulo similar al que tiene el paciente en estación. Con la otra mano se percute el ligamento tibio rotuliano, entre la rótula y la tuberosidad tibial con el martillo.

Vía aferente: fibras ascendentes sensitivas del nervio femoral.

Centro de integración: segmentos medulares L4-L6.

Vía eferente: alfa motoneuronas del nervio femoral que inerva musculatura extrafusar del músculo cuádriceps femoral.

Respuesta: la llegada de un estímulo provoca una contracción del cuádriceps femoral y una extensión de la rodilla con tendencia a la alineación femorotibial.

3-Tibial craneal. Ejecución: con el martillo se golpea el vientre del músculo tibial craneal en la región lateral de la cresta tibial.

Vía aferente: fibras aferentes del nervio peróneo.

Centro de integración: segmentos medulares L6-L7

Vía eferente: nervio peróneo.

Respuesta: flexión del tarso.

4- Gastrocnemio

Ejecución: se percute el tendón calcáneo común del músculo gastrocnemio, en la zona ligeramente proximal a su inserción en el calcáneo, mientras se mantiene la articulación tarsal ligeramente flexionada.

Vía aferente: nervio tibial.

Centro de integración: segmentos medulares L7-S1.

Vía eferente: nervio tibial.

Respuesta: leve extensión de la articulación tibio tarsal.

2.6.4 Otros reflejos

1-Reflejo perineal: especialmente importante en animales con disfunción urinaria.

Ejecución: se estimula la piel circundante al esfínter anal y la mucosa del propio esfínter, tocando o pellizcando suavemente con una pinza hemostática.

Vía aferente: nervio pudendo.

Centro de integración: segmentos medulares S1-S3 y caudales.

Vía eferente: nervio pudendo y caudales.

Respuesta: contracción del esfínter anal y flexión de la cola.

2- Reflejo cutáneo del tronco (panicular)

Ejecución: comenzando en la región lumbar caudal y avanzando en sentido craneal, se pellizca alternativamente la piel de las regiones para espinales derecha e izquierda con una pinza hemostática.

Vía aferente nervio sensitivo del segmento de piel estimulado que penetra en la médula espinal y remonta el fascículo propio.

Centro de integración: segmentos medulares C8-T1.

Vía eferente: N. torácico lateral.

Respuesta: contracción bilateral del músculo cutáneo del tronco.

3-Reflejos normalmente no observados en animales sanos y cuya existencia indica per se un déficit neurológico.

Extensor cruzado: al generar el reflejo flexor de un miembro el contralateral se extiende.

Centro de integración: intumescencia lumbar.

Vía eferente N. safeno, peróneo o tibial, vía eferente fibras nerviosas destinadas a los músculos extensores del miembro contralateral.

Respuesta: extensión mantenida del miembro contralateral.

Gradación de respuestas reflejas:

Ausente.....0

Disminuída.....1

Normal.....2

Aumentada.....3

Muy aumentada.....4

2.6.5 Evaluación de la marcha (registros en video)

Estas pruebas se hicieron a través del registro de video de la marcha de los pacientes. Para esto se permitió el desplazamiento de los sujetos en una superficie plana y libre de obstáculos, se registró el desplazamiento en video para su posterior análisis en cámara lenta en vista frontal, posterior y laterales (tanto derecha como izquierda). La evaluación de los videos se hizo con dos observadores los cuales asignaron puntaje de acuerdo a la escala desarrollada por Natasha Olby (Tab. 2.-1) para evaluación de la función del miembro pélvico en caninos con lesión medular aguda (Olby et al., 2001). Se realizaron en total cuatro registros de video, uno pretrasplante y posteriormente uno mensual por tres meses.

2.7 Análisis estadístico

Para analizar los resultados de la recuperación funcional mediante el examen neurológico y la evaluación de la marcha, se utilizó el Test estadístico de los Signos de dos colas, como prueba no-paramétrica en la cual se comparan los resultados pre-trasplante con cada uno de las respuestas obtenidas post-trasplante en las evaluaciones mensuales. Para esta prueba se consideró un valor de $p=0.05$.

2.8 Consideraciones éticas

Para todos los protocolos se tuvieron en cuenta las recomendaciones del ILAR (Internacional Laboratory Animal Research) (ILAR, 1994), la norma 64/432/CEE, 93/119/CE (1993) (modificada 526/CE-2007) la Ley 84 de 1989 y la ley 1774 del 6 de enero de 2016 de Colombia. El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. Todos los propietarios de los animales fueron informados sobre los riesgos de la anestesia en todos y cada uno de los procedimientos que la requirieron.

Tabla 2-1 Escala Olby para evaluación de miembros pélvicos en caninos

ESCALA OLBY PARA EVALUACIÓN DE FUNCIÓN DE MIEMBROS PÉLVICOS		
ESTADO	PUNTAJE	ESTATUS NEUROLÓGICO
1	0	No hay movimiento de miembros ni sensación de dolor profundo
	1	No hay movimiento de miembros pero si sensación de dolor
	2	No hay movimiento de miembros pero si movimiento voluntario de cola
2	3	Protracción mínima sin carga de peso de miembros pélvicos (movimiento de una articulación)
	4	Protracción sin carga de peso con una articulación. Involucró menos del 50% del tiempo.
	5	Protracción sin carga de peso con una articulación. Involucró más que el 50 % del tiempo.

Continuación tabla 2-1

3	6	Protracción con carga de peso menos del 10 % del tiempo.
	7	Protracción con carga de peso 10 a 50 % del tiempo.
	8	Protracción con carga de peso más del 50 % del tiempo.
4	9	Protracción con carga de peso 100% del tiempo con fuerza reducida. Error 90 % del tiempo.
	10	Protracción con carga de peso 100% del tiempo con fuerza reducida. Error en 50-90% del tiempo
	11	Protracción con carga de peso 100% del tiempo con fuerza reducida. Error menos del 50 % del tiempo.
5	12	Ataxia con fuerza normal pero errores más del 50 % del tiempo.
	13	Ataxia con fuerza normal pero errores menos del 50 % del tiempo.
	14	Marcha normal.

3. Resultados

3.1 Selección de los animales experimentales

Para la selección de los sujetos experimentales, y después de la convocatoria realizada, un total de treinta y nueve sujetos hicieron solicitud de ingresar al programa. Once de estos caninos cumplieron los criterios de inclusión descritos en la metodología, uno de estos sujetos fue sometido a eutanasia por voluntad de los propietarios y otro declinó justo una noche antes de la cita para la primera resonancia magnética, por lo que el número total de sujetos para el estudio quedó en nueve, de estos uno se retira luego del trasplante, en total ocho caninos participan hasta el final del estudio (Fig. 3-1)

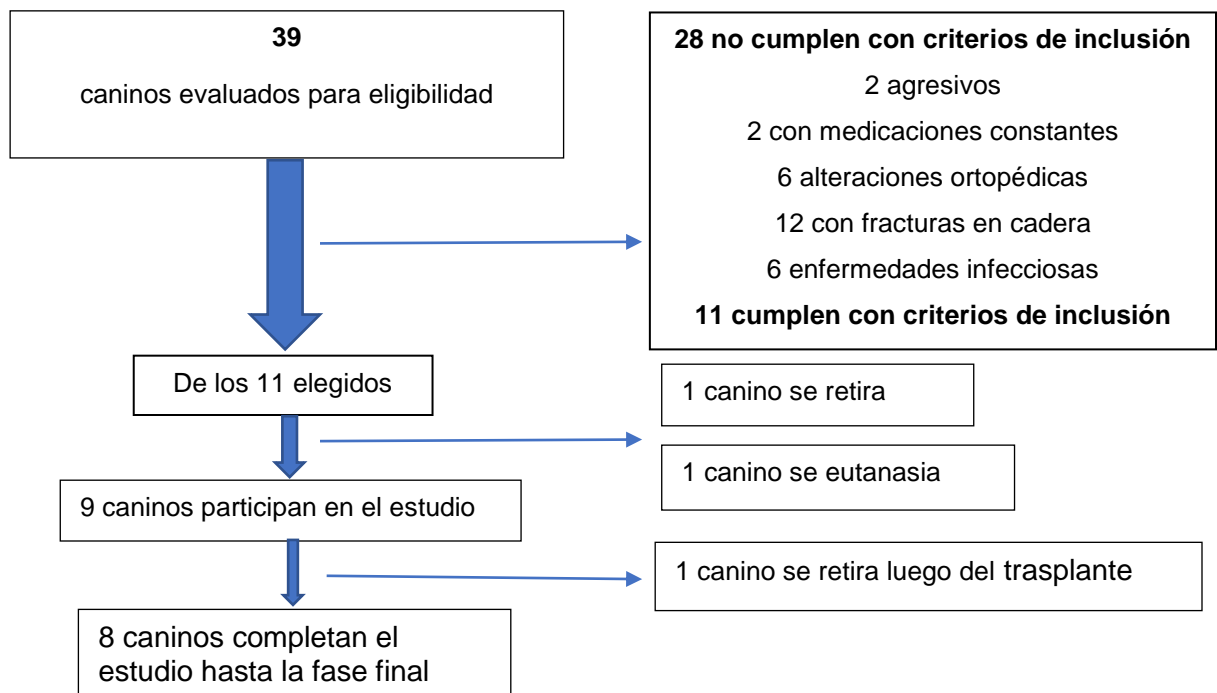


Figura 3-1. Proceso selección de pacientes

Como puede verse en la tabla 3.1, de los nueve sujetos experimentales elegidos, cuatro eran hembras y cinco machos, tres de raza criolla, dos pitbull, un pinsher, un Beagle, un labrador y un bulldog, la edad varió desde 1 año a 10 años con promedio de 4,9 años. El promedio de peso fue de 16,2 kg, siendo el mínimo 4 kg el máximo 30 kg. Al examen clínico todos presentaban alteración neurológica de origen traumático según reportaron sus propietarios. Con la evaluación por la escala de Olby se pudieron clasificar seis pacientes tenían paraplejía (con grado uno) en la escala, tres con puntaje de cero y tres, puntaje de uno. Otros tres presentaron paraparesia, dos obtuvieron puntaje de tres en la escala Olby (grado dos en esta escala) y uno puntaje de 8 (grado tres) (Tab. 3-1).

Tabla 3-1. Características de los pacientes seleccionados para el estudio

Sujeto(Puntaje)	Raza	Sexo	Edad	Lesión	Peso
1(1)	Beagle	Hembra	4 años	paraplejía	13 kg
2(3)	Criollo	Macho	4 años	paraparesia	8 kg
3(0)	Pinsher	Macho	3 años	paralejía	4 kg
4(3)	Criollo	Macho	4 años	paraparesia	14 kg
5(0)	Pitbull	Macho	8 años	paraplejía	27 kg
6(0)	Bulldog Francés	Hembra	10 años	paralejía	12 kg
7(1)	Criollo	Hembra	1 año	paraplejía	18 kg
8(1)	Pitbull	Hembra	7 años	paraplejía	30 kg
9(8)	Labrador	Macho	3.5 años	paraparesia	20 kg

3.2 Cultivo de las células de la glía envolvente olfatoria

Para la estandarización del cultivo primero se realizaron pruebas con mucosa olfatoria de cadáveres caninos, lo que conllevó a realizar tres cultivos alternados mensuales en los que se obtuvieron pocas células. Posteriormente se tomaron muestras de mucosa nasal mediante procedimiento endoscópico de caninos sanos voluntarios. Nuevamente en las primeras pruebas de cultivo se obtuvieron bajos porcentajes celulares hasta que al cuarto y quinto ensayo se decidió añadir a los constituyentes del medio de cultivo 2 micromoles de forskolina (sigma UK) tal como lo reportan (Jeffery et al., 2005; Granger et al., 2012). De esta manera se observó un notable incremento en el número de células disponibles para el trasplante.

Paso 1: Inicialmente las células se sembraron en el primer pozo de cajas Petri de seis pozos sin poli-L- lisina por 18 horas, hubo crecimiento de células grandes adheridas al

pozo con fenotipo fusiforme de citoplasma ancho y núcleos grandes centrales características compatibles con células mesenquimales (Fig 3-2).

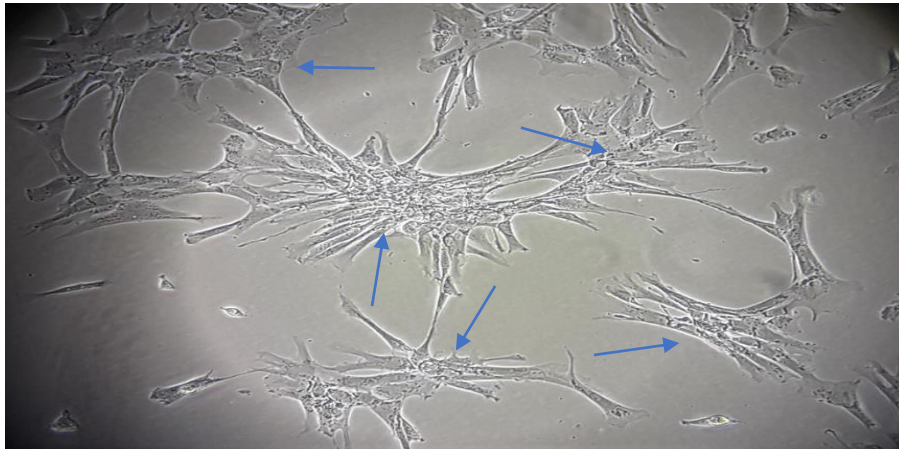


Figura 3-2 Cultivo de CGEO. Paso 1. Células en suspensión sin Poli-L-lisina. Se observan células de núcleos centrales y grandes compatibles con mesenquimales (flechas).

Paso 2. Luego se toma el sobrenadante del primer pozo y se siembra en el segundo pozo que tampoco contiene poli-L-lisina dejándose en incubación por 36 horas, pudiendo observar el crecimiento de células con diferentes morfologías adheridas al pozo. En esta ocasión se observan muy pocas células alargadas fusiformes con delgadas proyecciones y núcleos centrales alargados compatibles con CGEO, otra proporción mayor de células compatibles con células mesenquimales y fibroblastos (Fig 3-3).

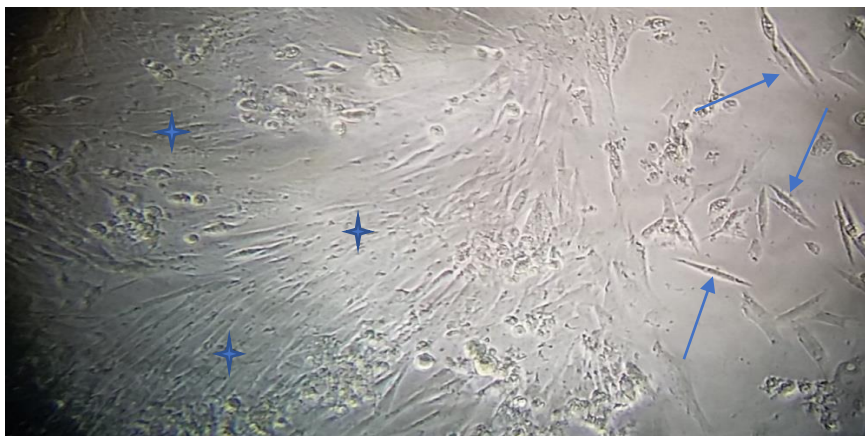


Figura 3-3. Cultivo de CGEO. Paso 2. Segunda siembra en platos sin poli-L-lisina. Se observan células fusiformes alargadas compatibles con CGEO (flechas), y células mesenquimales y fibroblastos (estrellas).

Paso 3. Luego de las 36 horas de cultivo se pasa ese sobrenadante al tercer pozo previamente recubierto con poli-L-lisina y se observa a las 48 horas. En esta ocasión se observaron adheridas al pozo en mayor proporción células alargadas, fusiformes, delgadas con prolongaciones finas y largas, núcleos centrales ovalados y nucleolos evidentes compatibles con CGEO, también en proporción menor se observaron células más grandes de citoplasma ancho con prolongaciones más gruesas compatibles con mesenquimales (Fig 3-4).

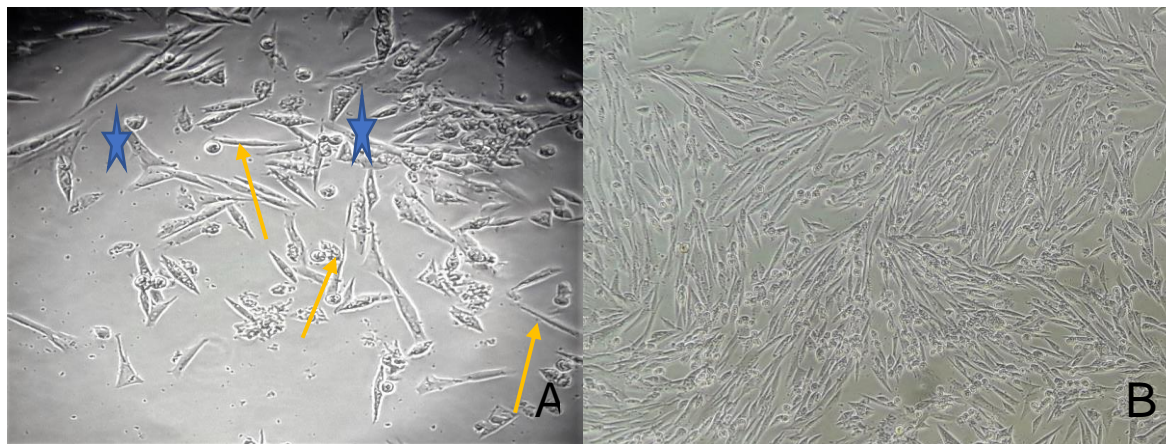


Figura 3-4. Cultivo primario de CGEO

Paso 3. Siembra en cajas con poli-L-lisina. Las células tienden a agruparse (A y B). Su forma característica alargada y fusiforme, (flechas), se observan escasas células mesenquimales en A (Estrella), en B gran proporción de CGEO.

A todos los cultivos de CGEO a trasplantar se les realizó cultivo microbiológico en el laboratorio de microbilología de la facultad y PCR para micoplasma en laboratorio de patología. En ninguna de las muestras se aislaron microorganismos a las 48 horas postincubación, igualmente las pruebas de PCR para micoplasma siempre fueron negativas, estos resultados brindaron tranquilidad y confianza para realizar el trasplante y corroboran que las células trasplantadas fueron seguras dado que no presentaron microorganismos infecciosos (Fig 3-5)

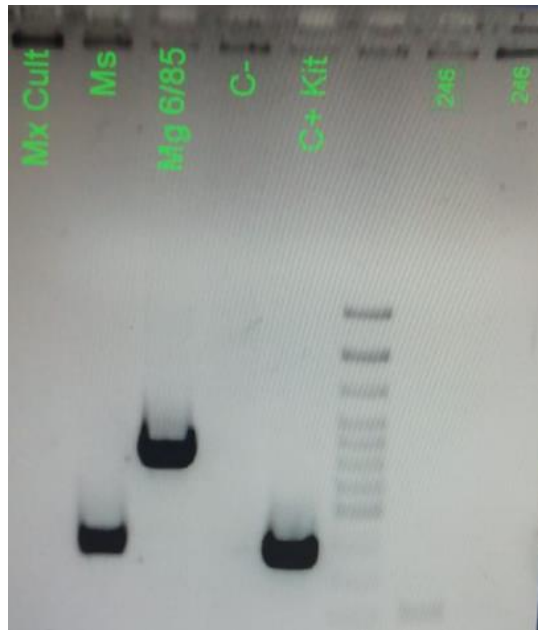


Figura 3-5. Prueba de PCR para micoplasma. Resultado negativo en la primera columna a la izquierda (muestra del cultivo), en la quinta columna el control positivo del kit, sexta columna el marcador de peso molecular.

A todos los pacientes sometidos al trasplante se les inyectó una suspensión celular conteniendo 10^6 células en un volumen total de 400 microlitos de medio para trasplante. Estas suspensiones contenían una mezcla de CGEO, fibroblastos, células mesenquimales y otras no identificadas, procedentes de la mucosa de la cavidad nasal olfatoria. En vista de que no fue posible hacer un conteo de CGEO con marcación específica por fluorescencia con p75, se hizo una contabilización cualitativa por morfología y se obtuvo así un promedio entre 30-50% de CGEO.

3.3 Evaluación de los pacientes

3.3.1 Seguridad de la técnica para la toma de la muestra

Una semana después de efectuado el procedimiento endoscópico de toma de muestra en los pacientes, los propietarios reportaron comportamiento normal de olfateo, apetito y manifestaron que no se presentó dolor, inflamación ni molestia alguna a la palpación de la región de las fosas nasales ni en la piel del hocico, tampoco manifestaron presencia de secreciones por ollares. Es decir, el procedimiento no ocasionó efectos secundarios

adversos a corto ni mediano plazo y por lo tanto consideramos es seguro para la toma de la muestra de cultivo.

3.3.2 Seguridad del procedimiento de trasplante

Una semana después del procedimiento de trasplante intramedular de las CGEO los propietarios reportaron normalidad en los pacientes en la región espinal intervenida y en su comportamiento de base. No presentaron dolor a la palpación ni cambios en el aspecto de la piel como eritema o calor ni tampoco secreciones de ningún tipo. La seguridad del trasplante también pudo confirmarse con la evaluación por resonancia magnética (Numeral 3.3.4).

3.3.3 Evaluación del efecto del trasplante en la respuesta al examen neurológico y evaluación de la marcha

Para la evaluación del efecto del trasplante a todos los pacientes se les realizó un examen neurológico y prueba de la evaluación de la marcha pre-trasplante y tres, post-trasplante con diferencia de un mes, junto con resonancia de control a los 90 días post-trasplante.

3.3.3.1 Examen neurológico

A continuación, se presentan los resultados de las pruebas del examen neurológico comparando los datos obtenidos en las evaluaciones pre-trasplante y las post- trasplante en todos los individuos mediante la prueba de los signos.

Pruebas de sensibilidad. En la tabla 3.2 se observan los resultados individuales para las variables sensoriales, (si) se refiere a los pacientes que mejoraron y (no) para los que no mejoraron. El primer y segundo mes postrasplante muestra cambios positivos en la sensibilidad de algunos pacientes, se observó que luego en el tercer mes post trasplante de los ocho caninos trasplantados que terminaron el estudio hasta el final siete mejoraron en diversos grados.

La tabla 3-3 presenta los resultados en sensibilidad comparando las respuestas pre trasplante con cada uno de los meses evaluados utilizando la prueba de los signos. El análisis muestra entonces que en el primer mes post-trasplante no hubo ningún resultado significativo de mejoría en la sensibilidad mientras que, en el segundo mes inicia la

recuperación sensitiva siendo evidente una mejoría en el desempeño sensorial viéndose resultados significativos en los dos miembros posteriores en las variables superficial, profunda, nervio safeno, nervio peróneo y nervio tibial. Estas mejorías se vieron en los pacientes 1,2,3,4,7 en todas las variables de los dos miembros posteriores, en el paciente 8 solamente en la sensibilidad profunda y en el paciente 9 en todas las variables del miembro posterior derecho. Finalmente, en el tercer mes fue evidente que esta recuperación sensorial se mantuvo en las variables que mejoraron en el mes anterior y se observa que en los pacientes 8 y 9 se obtiene recuperación en todas las variables en ambos miembros.

Tabla 3-2. Resultados individuales para las variables sensoriales

PRIMER MES																
Paciente	1		2		3		4		6		7		8		9	
	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD
Superficial	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
Profunda	No	No	Si	Si	No	Si	No	No	No	No	No	No	Si	Si	No	No
Safeno	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
Peróneo	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No
Tibial	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	No	No	no	no	no	no
SEGUNDO MES																
Paciente	1		2		3		4		6		7		8		9	
	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD
Superficial	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No	No	No	Si
Profunda	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	No	Si
Safeno	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No	No	No	Si
Peróneo	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No	No	No	Si
Tibial	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No	No	No	Si
TERCER MES																
Paciente	1		2		3		4		6		7		8		9	
	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD	MPI	MPD
Superficial	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Profunda	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Safeno	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Peróneo	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Tibial	si	si	si	si	si	si	si	si	no	no	Si	Si	Si	Si	Si	Si

MPI= miembro posterior izquierdo, MPD=miembro posterior derecho, No=no mejoró, Si=mejoró

Tabla 3-3. Resultados pruebas neurológicas de sensibilidad. Se compararon los datos pre-trasplante con la evaluación post-trasplante en los meses primero segundo y tercero, post-trasplante mediante el test de los signos.

PRIMER MES						
VARIABLE	MPI			MPD		
	Z	P	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Superficial	1,73205	0,08326	NS	1,73205	0,08326	NS
Profunda	1,4142	0,1573	NS	1,7320	0,08326	NS
Safeno	1,73205	0,08326	NS	1,73205	0,08326	NS
Peróneo	173.205	0,08326	NS	1,73205	0,08326	NS
Tibial	1,73205	0,08326	NS	1,73205	0,08326	NS

SEGUNDO MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	P	Resultado	Z	p	Resultado
Superficial	2	0,0455	S	2,236	0,0253	S
Profunda	2	0,0455	S	2,236	0,0253	S
Safeno	2	0,0455	S	2,236	0,0253	S
Peróneo	2	0,0455	S	2,236	0,0253	S
Tibial	2	0,0455	S	2,236	0,0253	S

TERCER MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	P	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Superficial	2,6457	0,00408	S	2,6457	0,00815	S
Profunda	2,6457	0,00408	S	2,6457	0,00815	S
Safeno	2,6457	0,00408	S	2,6457	0,00815	S
Peróneo	2,6457	0,00408	S	2,6457	0,00815	S
Tibial	2,6457	0,00408	S	2,6457	0,00815	S

MPI= Miembro posterior izquierdo, MPD= miembro posterior derecho, NS= no significativo, S=significativo

Pruebas de reacciones posturales y propiocepción general. La tabla 3.4 muestra los resultados de las pruebas de reacciones posturales y propiocepción general luego de comparar los puntajes de miembros posteriores izquierdos y derechos pretrasplante mediante el test de los signos con los resultados de los tres meses post-trasplante. En ninguno de los tres meses se obtuvieron cambios significativos en ninguna de las variables establecidas.

Aunque individualmente algunos pacientes como aquellos que manifestaron paresia (2 y 9) y uno plejía paciente 7 (en total tres) presentaron cambios en los puntajes de algunas de estas variables. Por ejemplo, el paciente 2 mejoró al primer mes postrasplante en nudillos, colocación visual y táctil en los dos miembros posteriores, pasó de 0 a 1 el primer mes, manteniendo ese puntaje estable hasta el tercer mes. En estancia y marcha en bípedo lateral, extensor postural y reacción tónica de cuello, sus puntajes se comportaron de manera similar, estos cambios se mantuvieron constantes hasta el tercer mes. También mejoró en el desempeño en la prueba de carretilla con puntaje de 0 a 1 en el segundo mes manteniéndose en ese nivel sin más cambio hasta el tercer mes (Anexo 3 tabla de resultados originales).

El paciente 7 que presentó paraplejía mejoró el desempeño al tercer mes en las pruebas de estancia y marcha en bípedo lateral, extensor postural y reacción tónica de cuello de ambos miembros pasando de un puntaje de 0 a 1 en el tercer mes. El paciente 9 que presentó paraparesia mejoró al primer mes en un punto pasó de 0 a 1 en colocación visual y táctil y nudillos de MPD, en mes dos MPI pasó a 1 y el MPD pasó a 2 y al tercer mes ambos miembros llegaron a un puntaje de 2. De manera parecida en las pruebas estancia y marcha en bípedo lateral, extensor postural y reacción tónica de cuello, con la diferencia que sólo pasó de 0 a 1, no alcanzó el 2 al tercer mes. También mejoró en la prueba de carretilla al segundo mes pasando de 0 a 1 y manteniendo ese puntaje al tercer mes (ver anexo 3).

Tabla 3-4. Resultados de reacciones posturales y propiocepción general. Comparación con el test de los signos, pre trasplante versus primer, segundo y tercer mes postrasplate

PRIMER MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	p	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Nudillos	1	0,31731	NS	0,57735	0,5637	NS
Colocación visual	1	0,31731	NS	1,41421	0,1573	NS
Salto sobre una extremidad	0,000	1,000	NS	0,000	1,000	NS
Estancia y marcha en bipedo lateral	1,000	0,317	NS	0,000	1,000	NS
Extensor postural	1,000	0,317	NS	1,414	0,157	NS
Reacción tónica del cuello	1,000	0,317	NS	1,414	0,157	NS
Carretilla	0,000	1,000	NS	0,000	1,000	NS
SEGUNDO MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	p	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Nudillos	1,4142	0,1573	NS	0,5773	0,5637	NS
Colocación visual y táctil	1,4142	0,1573	NS	1,4142	0,1573	NS
Salto sobre una extremidad	0	1	NS	0	1	NS
Estancia y marcha en bípedo lateral	1,1442	0,1573	NS	1,4142	0,1573	NS
Extensor postural	1,4142	0,1573	NS	1,4142	0,1573	NS
Reacción tónica de cuello	1,4142	0,1573	NS	1,4142	0,1573	NS
Carretilla	1,4142	0,1573	NS	1,4142	0,1573	NS
TERCER MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	p	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Nudillos	1,4142	0,1573	NS	1,4142	0,1573	NS
Colocación visual y táctil	1,4142	0,07865	NS	1,4142	0,1573	NS
Salto sobre una extremidad	0,0000	0,5000	NS	0,0000	1,0000	NS
Estancia y marcha en bípedo lateral	1,7320	0,0832	NS	1,7320	0,0832	NS
Extensor postural	1,7320	0,0832	NS	1,7320	0,0832	NS
Reacción tónica de cuello	1,7320	0,0832	NS	1,7320	0,0832	NS
Carretilla	1,4142	0,07865	NS	1,4142	0,1573	NS

NS=no significativo

Reflejos. La tabla 3.5 muestra los resultados de las variables reflejos en la comparación de los miembros izquierdos y derechos antes y después del trasplante durante los tres meses mediante la prueba de los signos. El primer mes el único reflejo que mejoró de manera significativa fue el reflejo patelar, con mejoría en ambos miembros

posteriores. El segundo y tercer mes, los reflejos patelares, tibial craneal y cutáneo del tronco tanto derechos como izquierdos arrojaron resultados de mejoría significativos. De manera individual podemos evidenciar que el paciente 1 presentó cambio de puntaje al examen neurológico en reflejos patelar, tibial craneal y gastrocnemio de un puntaje de 3 pasó a 2 en ambos miembros el primer mes manteniendo ese puntaje constante hasta el tercer mes, pasando de hiperreflexia a normo reflexia, el reflejo cutáneo del tronco en pretrasplante se encontraba a nivel de L1, al primer mes en L3, al segundo y tercer mes en L5. Este paciente presentó extensor cruzado en ambos miembros en pretrasplante, desapareciendo al primer mes postrasplante.

El paciente 2 en los reflejos patelar y tibial craneal pasó de 3 a 2 al segundo mes, manteniéndose igual hasta el tercer mes. Su reflejo cutáneo del tronco en pretrasplante se encontraba a nivel T11, al primer mes en L2, al segundo y tercer mes en L5. El tercer paciente en los reflejos patelar y tibial craneal pasó de puntaje 3 a 2 el primer mes siguiendo igual al segundo y tercer mes. El reflejo cutáneo del tronco en pretrasplante se encontraba en T10 y pasó a L1 el primer mes, al segundo y tercer mes en L5. El paciente cuatro sus reflejos patelar y tibial craneal pasaron de puntaje de 3 a 2 al segundo mes manteniéndose igual en tercer mes. Su reflejo cutáneo del tronco estuvo siempre en L5.

El paciente 6 todo en cero durante la duración del estudio, su reflejo cutáneo del tronco se mantuvo siempre en L3. El paciente siete pasó el reflejo patelar de 4 a 3 el primer mes y pasó de 3 a 2 el tercer mes, el tibial craneal de 3 a 2 al segundo mes manteniéndose así en el tercer mes. Su cutáneo del tronco en pretrasplante estaba en T6, al primer mes postrasplante pasó a T9, a T10 el segundo mes y a T12 el tercer mes. El paciente ocho el reflejo patelar pasó de 3 a 2 al segundo mes postrasplante, sin cambio al tercer mes, el cutáneo del tronco en pretrasplante a nivel T7, en T9 al primer mes, en T10 al segundo mes y en T13 al tercer mes. En el paciente nueve el reflejo patelar pasó de 4 a 3 el primer mes y de 3 a 2 el tercer mes. El tibial craneal de 3 a 2 el segundo mes, el reflejo cutáneo del tronco cambió mensualmente de T6 a T9 a T10 y a T12.

Tabla 3-5. Resultados de los reflejos por el test de los signos pre trasplante primero, segundo y tercer mes post trasplante

PRIMER MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	P	RESULTADO	Z	P	RESULTADO
Flexor	0	1	NS	0	1	NS
Patelar	2	0,0455	S	2	0,0455	S
Tibial craneal	1	0,3173	NS	1,7320	0,0832	NS
Gastrocnemio	1	0,31731	NS	1	0,31731	NS
Perineal	0,0000	1,0000	NS	0,576	0,537	NS
Cutáneo del tronco	0,0000	1,0000	NS	0,000	1,000	NS
Extensor cruzado	1,4142	0,1573	NS	1,414	0,157	NS

Continuación tabla 3-5

SEGUNDO MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	P	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Flexor	0	1	NS	0	1	NS
Patelar	2,44949	0,0143	S	2,64575	0,00815	S
Tibial craneal	2,44949	0,01431	S	2,44949	0,01431	S
Gastrocnemio	1	0,31731	NS	1	0,31731	NS
Perineal	1,000	0,317	NS	1,000	0,317	NS
Cutáneo del tronco	2,000	0,046	S	2,000	0,046	S
Extensor cruzado	1,414	0,157	NS	1,414	0,157	NS

TERCER MES						
VARIABLE	IZQUIERDO			DERECHO		
	Z	P	RESULTADO	Z	p	RESULTADO
Flexor	0	1	NS	0	1	NS
Patelar	2,64575	0,00815	S	2,64575	0,00815	S
Tibial craneal	2,44949	0,01431	S	2,44949	0,01431	S
Gastrocnemio	1	0,3173	NS	1	0,3173	NS
Perineal	1,00000	0,1588	NS	1,00000	0,3173	NS
Cutáneo del tronco	2,64575	0,00815	S	2,64575	0,00815	S
Extensor cruzado	1,4142	0,0786	NS	1,4142	0,1573	NS

NS=no significativo, S= significativo

3.3.3.2 Evaluación de la marcha

Con el objetivo de analizar la marcha en los pacientes trasplantados, especialmente del tren posterior se realizaron videos que fueron calificados mediante el uso de la escala Olby (Ver tabla 2.1 en Materiales y Métodos). En total se analizaron cuatro videos por paciente, uno antes del trasplante, y otros tres para cada uno de los meses postrasplante. Estos resultados se muestran en la figura 3-6 y en detalle en la tabla 3-6.

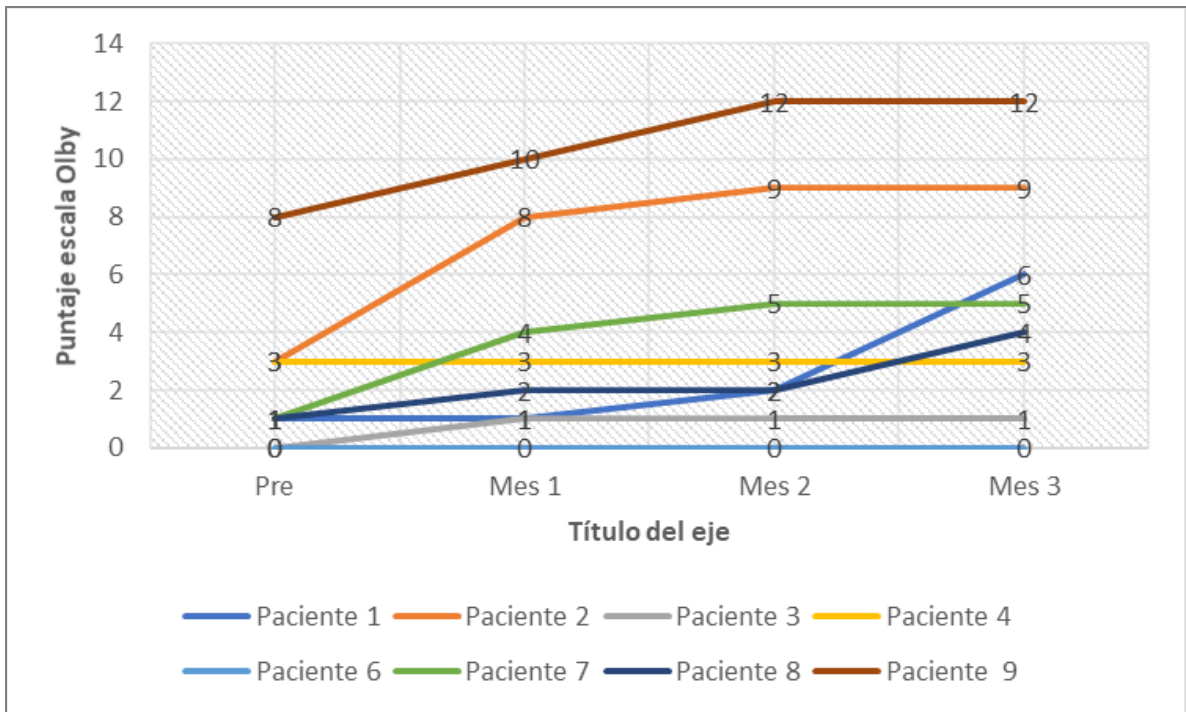


Figura 3-6. Resultados de la evaluación de la marcha en la escala Olby.

De la evaluación de los videos se resalta que de los ocho pacientes que cumplieron todo el proceso los pacientes, 3, 4 y 6, no mostraron cambios de estado de acuerdo a la clasificación en la escala Olby. El paciente 3, con una lesión de siete meses, se le asignó un puntaje de 0 antes del trasplante y durante los meses de evaluación obtuvo un puntaje de 1, manteniéndose por lo tanto en el estado 1 en la escala. El paciente 4, con lesión de 10 meses, obtuvo puntaje de 3 tanto en pretrasplante como en los tres meses posteriores, es decir se mantuvo en el estado 2 en la escala Olby. El sujeto número 6, con lesión de 11 meses tampoco tuvo cambios presentando un 0 en la escala de Olby tanto en pretrasplante como en los tres meses postrasplante, se mantuvo en el estado 1 en la escala Olby.

Los cinco pacientes restantes mostraron mejoría en diversos grados así, el paciente 1, con una lesión de 24 meses de duración, antes del trasplante obtuvo un puntaje de 1 en la escala Olby, el primer mes se mantuvo igual, el segundo mes pasó a 2 y al tercero a 6, pasando del estado uno al estado tres en la escala Olby. Dicho paciente inició el estudio presentando patrón de tijera por espasticidad y al tercer mes post-trasplante fue capaz de sostenerse en posición cuadrúpeda durante 4-6 segundos (fig 3-7)

El paciente 2 con una lesión de ocho meses, obtuvo puntaje de 3 antes del trasplante, luego 8 al primer mes, 9 al segundo y tercer mes, pasando del estado dos al estado 4 desde el segundo mes post trasplante. Los pacientes 7 y 8 sus resultados moderados de mejoría en la marcha. El número 7, con lesión de 8 meses se calificó pre-trasplante con puntaje 1, al primer mes postrasplante obtuvo 4 y en el segundo y tercer mes postrasplante 5, pasó del estado uno al estado dos en la escala Olby. Así mismo el paciente 8, con lesión de 24 meses, en prestrasplante calificó con puntaje de 1, al primer mes y al segundo mes 2 y al tercer mes 4, pasando del estado uno al estado dos en la escala Olby. El paciente 9 (36 meses de lesión) paso de un puntaje de 8 antes del trasplante, a 10 en el primer mes y 12 en el segundo y tercero. Pasó del estado tres al cinco.



Figura 3-7. Paciente 1 pre-trasplante en A patrón de tijera por espasticidad, en B tercer mes pos-trasplante posición cuadrúpeda 4-6 seg.

Cuando se efectuó la prueba estadística de los signos para el análisis de la marcha, comparando los puntajes en la escala Olby pre trasplante versus cada uno de los meses de evaluación se encontró que los cambios en la actividad de la marcha fueron significativos en todos los meses evaluados (Tab. 3-7).

Tabla 3-6. Puntajes de la evaluación de la marcha en la escala de Olby en pretrasplante y postrasplante

Sujeto	Pretrasplante Puntaje/estado	Mes 1 Puntaje/estado	Mes 2 Puntaje/estado	Mes 3 Puntaje/estado	Observaciones
1	1/1	1/1	2/1	6/3	1 patrón de tijera por espasticidad 2 movimiento voluntario de cola 6 protracción de MPI, al tercer mes se levantó y se mantuvo en posición cuadrúpeda por 4-6 segundos. Incontinente urinaria.
2	3/2	8/3	9/4	9/4	3 Movimientos de cola. 9 Domina esfínteres
3	0/1	1/1	1/1	1/1	1 Por tracción mecánica hace suspensión de cadera. Al segundo mes postrasplante suspendido en el aire realiza movimientos de pedaleo con los miembros posteriores. Al tercer mes en posición cuadrúpeda mantiene la carga de peso en miembros post por 10-12 segundos. Retención urinaria.
4	3/2	3/2	3/2	3/2	Protracción de cadera de MPI en todos los tiempos, la espasticidad de miembros posteriores le facilita la posición cuadrúpeda. Incontinente urinario y fecal.
5	0				Paraplejía
6	0/1	0/1	0/1	0/1	Paraplejía, sin cambios, incontinencia urinaria y fecal
7	1/1	4/2	5/2	5/2	En posición cuadrúpeda realiza soporte de autocarga asistida con movimiento rítmico de miembros, es capaz de iniciar marcha. Con ayuda realiza marcha cuadrúpeda. Retención urinaria.
8	1/1	2/1	2/1	4/2	En posición cuadrúpeda realiza soporte de autocarga asistida con MPI. Protracción mínima en cadera que no la mantiene en el tiempo. Con MPI realiza protracción sin carga de peso en cadera 20 % del tiempo. Se sostiene en posición cuadrúpeda por tres segundos. Movimiento de cola, retención urinaria.
9	8/3	10/4	12/5	12/5	Mueve cola controla esfínteres.

Cabe aclarar que el paciente 5, con una lesión de 10 meses obtuvo en pretrasplante 0, desafortunadamente, después de aplicado el trasplante los dueños no regresaron, y no se pudieron llevar a cabo las evaluaciones post trasplante.

Tabla 3-7. Resultados de la evaluación de la marcha utilizando el test de los signos.

RESULTADOS DE ANALISIS DE MARCHA			
PERIODO	Z	p	RESULTADO
Primer mes	2,23607	0,02535	Significativo
Segundo mes	2,44949	0,01431	Significativo
Tercer mes	2,44949	0,01431	Significativo

3.3.4 Evaluación por imagenología de resonancia magnética (RM)

Para completar la evaluación funcional, se determinó realizar RM para evaluar cambios morfológicos en la ME después del trasplante. Todos los pacientes fueron sometidos a dos procedimientos uno pre-trasplante y otro el tercer mes post- trasplante. Las imágenes de RM tomadas antes del trasplante se utilizaron en primer lugar para determinar con exactitud el sitio preciso de la lesión y así decidir el sitio pertinente de inyección del trasplante (Tab. 3.8). En segundo lugar, se hizo una comparación entre las imágenes pre y post-trasplante, sin embargo, la evaluación detallada mostró que no había diferencias morfológicas significativas que pudieran indicar mejoría. No obstante, estas imágenes fueron muy valiosas para analizar la seguridad del trasplante y revelaron que no hay cambios morfológicos compatibles con procesos patológicos recientes que pudieran reaccionarse con el trasplante y que por lo tanto éste es seguro en este aspecto. Es de anotar que en todos los casos luego de la aplicación de la sustancia de contraste paramagnética intravenosa, no se observaron alteraciones de la señal del parénquima medular que pudieran hacer sospechar de la presencia de lesiones de tipo degenerativo, isquémico y/o neoplásico.

Comparación de resonancia pre y post trasplante.

Se presentan a continuación de manera detallada los hallazgos de las tomas de RM pre y post de cada uno de los pacientes (Tab. 3.8, Figs. 3.8 - 3.16). En ningún caso hubo cambios morfológicos entre las imágenes pre y post.

Paciente 1: Mostró severa compresión medular en sagital T2 por una protusión discal dorsal bilateral a nivel del espacio L2-L3, generando estenosis de aproximadamente el 50 % del canal vertebral con compresión de la médula y de las raíces nerviosas respectivamente y alteración en la alineación de ambas (Fig 3.8 A y C). Severa hidromielia en axial T2 tanto en la toma pre como la postrasplante (Fig. 3.8 A y D). Luego de la aplicación de la sustancia de contraste paramagnética intravenosa no se observaron alteraciones de la señal del parénquima medular que pudieran hacernos sospechar de la presencia de lesiones de tipo degenerativo, isquémico o neoplásico intra o extradural, esto último se cumplió para todos los pacientes

Paciente 2: En imágenes obtenidas en plano sagital y axial en secuencias T2 se observó alteración de la señal de todos los discos del segmento estudiado, visualizándose los mismos con señal hipointensa como consecuencia de proceso degenerativo de deshidratación mineralización. Se observa además hipertrofia de los anillos fibrosos de variado grado, pudiéndose considerar por ambos eventos la presencia de una enfermedad degenerativa compresiva discal múltiple. A nivel del espacio T12-T13 se aprecia una marcada protusión discal en posición dorso central que deforma el saco dural (Fig 3-9 A y B).

Tabla 3-8. Hallazgos de resonancias realizadas en los sujetos

Sujeto	Raza	Sitio de lesión y punto de inyección	Hallazgos Resonancia pretrasplante	Hallazgos resonancia postrasplante a los tres meses	Tiempo transcurrido de lesión
1	Beagle	L2-L3	Severa compresión medular con cambios estructurales del espacio y del parénquima medular (L2-L3), generada por la presencia de una protusión discal dorso bilateral. Alteración de longitud de L2 y de la alineación de ambas vértebras.	Sin cambios	24 meses
2	Criollo	T12-T13	Marcada estenosis del canal por presencia de una protusión discal en posición dorso central (T12-T13)	Sin cambios	8 meses
3	Criollo	T12-T13	Severa estenosis del canal por luxofractura.en espacio T12-T13.	Sin cambios	7 meses

Continuación tabla 3-8

4	Criollo	L3-L4	Severa estenosis del canal en espacio L3-L4 con cambio de señal de los cuerpos vertebrales y engrosamiento del parénquima medular con presencia de cavidades siringomiélicas.	Sin cambios	10 meses
5	Pitbull	T13-L1	Severa estenosis del canal por presencia de proliferación de tejidos blandos a nivel del espacio T13-L1, con protusión dorso central leve.		10 meses
6	Bulldog Francés	L2-L3	Craneal a L3 se observa severa hidromielia, que genera un acentuado proceso degenerativo del parénquima medular. Severa enfermedad degenerativa compresiva discal múltiple.	Sin cambios	11 meses
7	Criolla	T8-T9	Falta de alineación entre vértebras T8-T9, severa estenosis del canal con imagen compatible con mielomalacia.	Sin cambios	8 meses
8	Pitbull	T9-T10	Estenosis adquirida del canal, presencia de edema medular. T9-T10. Protusión discal en posición dorso centro lateral derecha, edema medular.	Sin cambios	24 meses
9	Labrador	T10-T11	Alteración de la alineación articular en T10-T11 que podría corresponder a secuela traumática. Cambios de señal en parénquima medular de tipo degenerativo en este lugar.	Sin cambios	36 meses

T=toracica, L=lumbar

Paciente 3: En las imágenes obtenidas en planos sagital y transversal en secuencias T2, se observa alteración de la señal de todos los discos del segmento toraco lumbar. Se aprecia severo daño estructural del espacio T12-T13, con disminución de la longitud rostro caudal del cuerpo de T12. Se aprecia además subluxación de esta articulación, con incremento de la xifosis. Se aprecia cabalgamiento de T13 sobre el cuerpo de T12. Se observa elevación del piso del canal en este sector, en posición dorso central con la consiguiente contusión medular y severa estenosis del canal. (Fig 3.10).

Paciente 4: Presentó alteración de la señal de todos los discos del segmento toraco lumbar. Se aprecia severo daño estructural del espacio L3-L4 con alteración de las carillas articulares, apreciándose espondilosis deformante ventral y presencia de una protusión discal dorso centro lateral izquierda. En relación con este espacio se observa a nivel medular una cavidad pseudosiringomiélica de aproximadamente 1,7 cm de longitud (Fig.3-11).

Paciente 5: Presentó una severa estenosis del canal a nivel del espacio T13-L1, generada por alteración estructural de ambos cuerpos vertebrales apreciándose un proceso inflamatorio oostero proliferativo, con disminución del diámetro lateral del canal afectando el parénquima medular (Fig 3-12)

Paciente 6: Se observó alteración de la señal de todos los discos del segmento estudiado, visualizándose los mismos con señal hipointensa como consecuencia de proceso degenerativo de deshidratación mineralización. Se observa además hipertrofia de los anillos fibrosos de variado grado pudiéndose considerar por ambos eventos, la presencia de una enfermedad degenerativa compresiva discal múltiple. Craneal a L3 se observa una severa hidromielia que genera un acentuado proceso degenerativo del parénquima medular (Fig 3-13).

Paciente 7: Se observó un correcto estado de hidratación de los discos no afectados, presentando los mismos señal hiperintensa normal. A nivel del espacio T8-T9 se observa secuela de subluxación, apreciándose una falta de alineación entre ambas vertebrales con descenso del piso del canal caudal a este espacio por listesis ventral de T9. El parénquima medular en este sector presenta señal hiperintensa, que podría corresponder a mielomalacia, como consecuencia de la contusión medular pre existente (Fig 3-14).

Paciente 8: Presentó marcada protusión discal en posición dorso centro lateral derecha, que deforma el saco dural, apreciándose saturación de la señal del parénquima medular como consecuencia de la presencia de edema (Fig 3-15).

Paciente 9: El espacio T10-T11 presenta severa estenosis del canal y alteración de la línea articular, que podría corresponder a la presencia de hemivértebra y/o a secuela traumática. El parénquima medular presenta en este sector cambios de señal de tipo degenerativo (Fig 3-16).

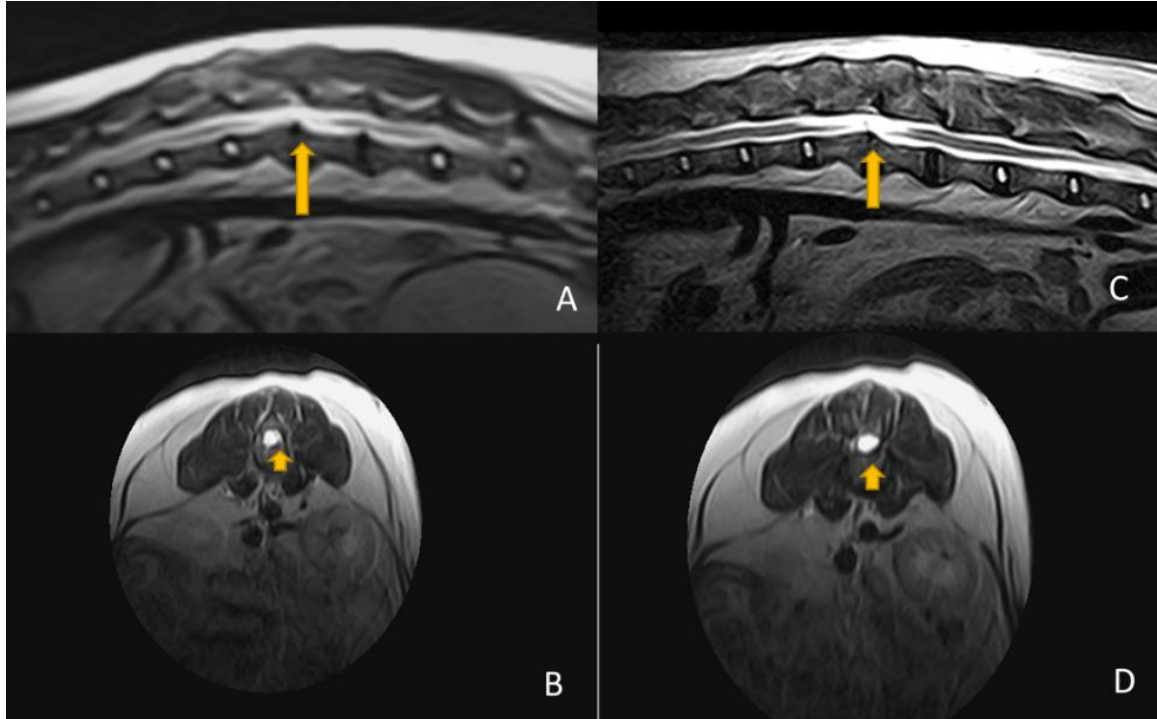


Figura 3-8. RM paciente 1. A) Corte sagital en T2 pretrasplante. Se observa severa alteración estructural a nivel del espacio L2-L3 generada por la presencia de una protusión discal, que eleva el piso del canal y afecta ambos forámenes (flecha amarilla). Severa hidromielia. B) Corte axial en T2 Pretrasplante se observa hidromielia. (flecha amarilla). En C Sagital en T2 Postrasplante, sin evidencia de cambios significativos al compararla con T2 pretrasplante. En D Axial en T2 Postrasplante, no se observan cambios. Hidromielia (flecha amarilla).

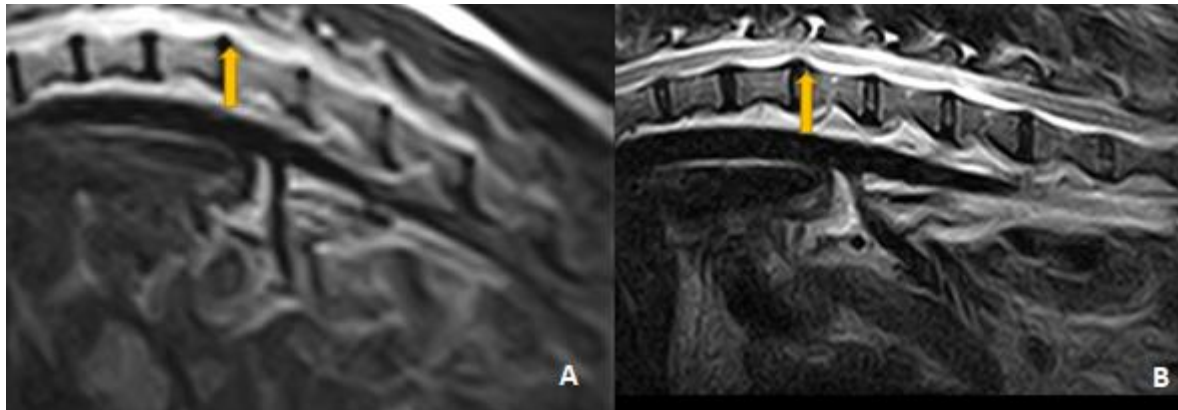


Figura 3-9. RM paciente 2. A) Sagital en T2 pretrasplante. Marcada estenosis del canal en espacio T12-T13 como consecuencia de una protusión en posición dorso central, con severa compresión medular. Se observa alteración de la señal de todos los discos del segmento estudiado, visualizándose los mismos con señal hipointensa como consecuencia de un proceso degenerativo de deshidratación/ mineralización. B) sagital en T2 postrasplante no se aprecian cambios significativos.

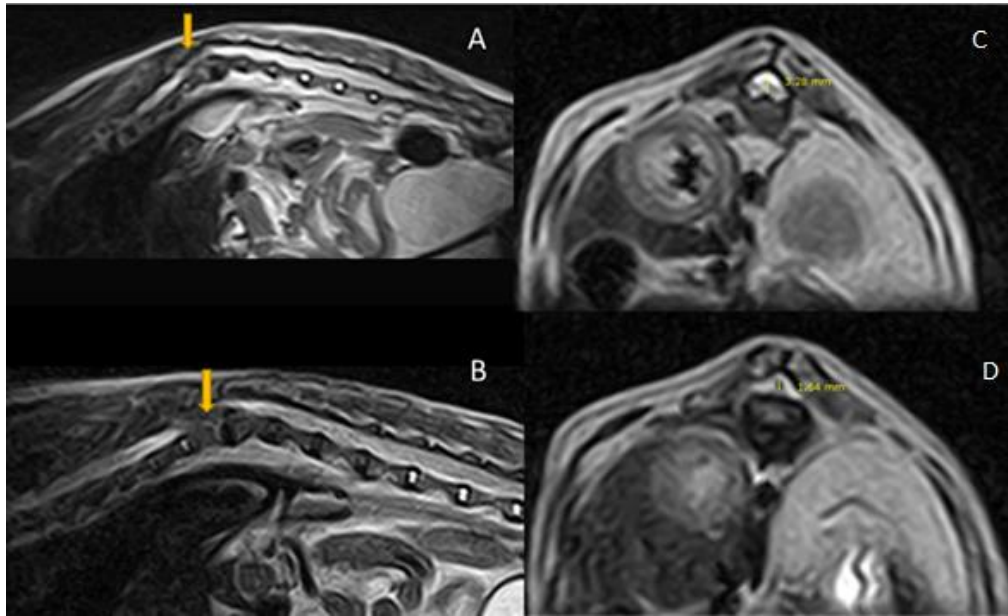


Figura 3-10. RM paciente 3. A) Sagital T2 pretrasplante Se aprecia subluxación articulación T12-T13 con incremento en la cifosis y cabalgamiento de T13 sobre T12, observándose elevación del piso del canal en posición dorso central con la consiguiente contusión medular y severa estenosis del canal. Obsérvese la continuidad medular(flecha amarilla). B) Corte sagital en T1 postrasplante se observa la xifosis pero la imagen no permite ver la continuidad medular. En C y D axiales pretrasplante en T1 se midió el diámetro medular vertical a nivel de lumbar L1-L2 (3,28 mm) y a nivel de la lesión (1,64 mm).

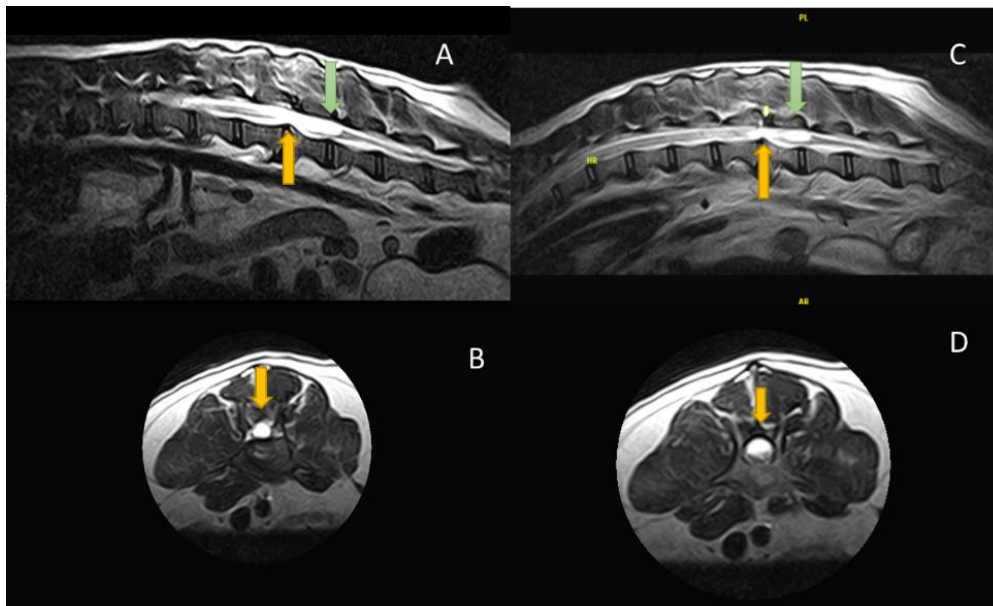


Figura 3-11. RM paciente 4. En A sagital T2 pretrasplante. Se aprecia severo daño estructural del espacio L3-L4 con alteración de las carillas articulares, apreciándose espondilosis deformante ventral y presencia de una protrusión discal dorso centro lateral izquierda (flecha amarilla). Se observa a nivel medular una cavidad pseudosiringomielica de aproximadamente 1,7 cm de longitud (flecha verde). En B axial en T2 se observa la cavidad a nivel L4 (flecha amarilla). En C sagital en T2 postrasplante y en D axial en T2 postrasplante no se observan cambios.

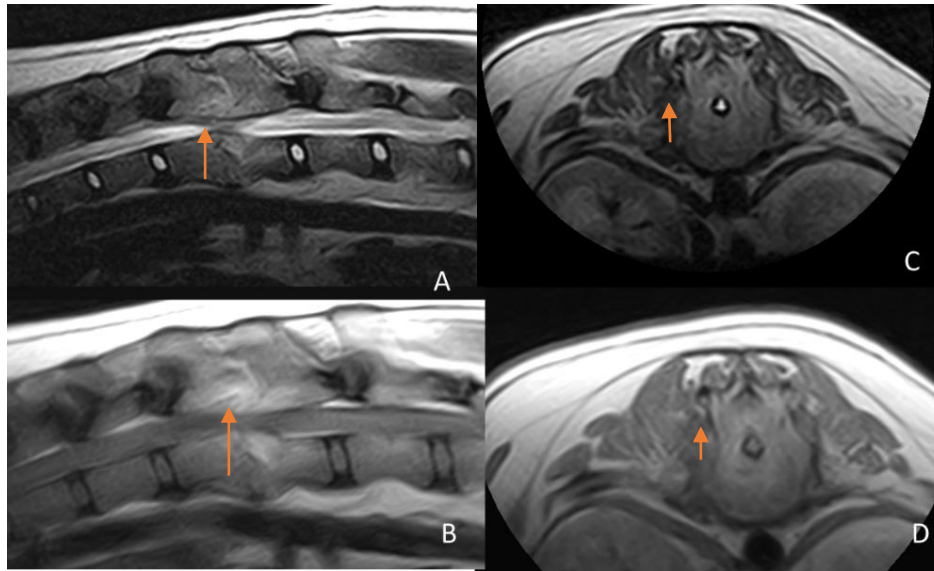


Figura 3-12 RM paciente 5. En A sagital T2 y en B sagital T1 pretrasplante se observa severa estenosis del canal a nivel del espacio T13-L1 flecha amarilla, por la proliferación de tejidos blandos y alteración de ambos cuerpos vertebrales apreciándose proceso inflamatorio osteoproliferativo. En C axial T2 y en D axial T1 pretrasplante se aprecia la compresión del parénquima medular, flecha amarilla.

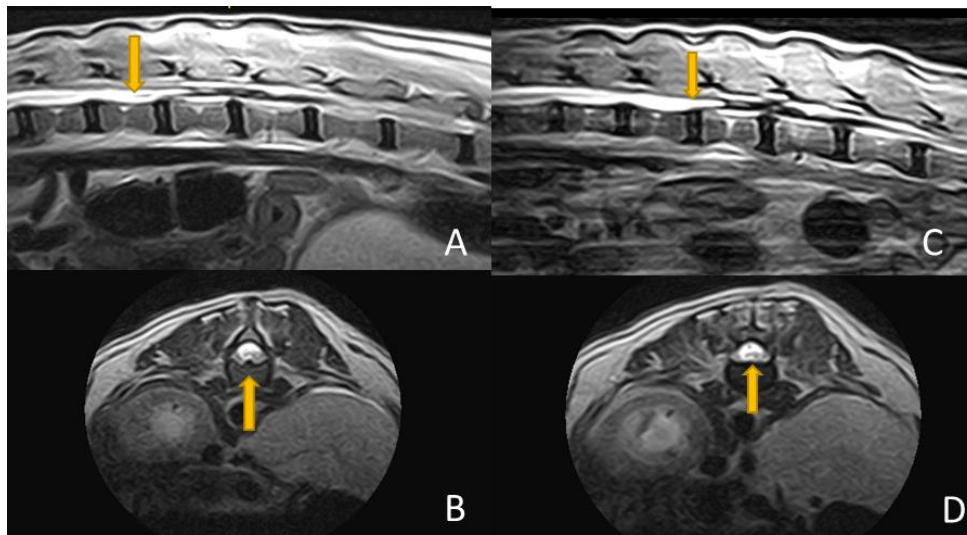


Figura 3-13. RM paciente 6. A) Sagital T2 pretrasplante craneal a L3 se observa una severa hidromielia (flecha amarilla) que genera un acentuado proceso degenerativo del parénquima medular. Diferentes grados de deshidratación de discos intervertebrales de T12 hasta sacro. En B axial T2 se observa hidromielia a nivel L3. En C sagital en T2 postrasplante y en D axial T2 postrasplante no se observan cambios. Imágenes compatibles con severa enfermedad degenerativa compresiva discal múltiple, proceso degenerativo medular.

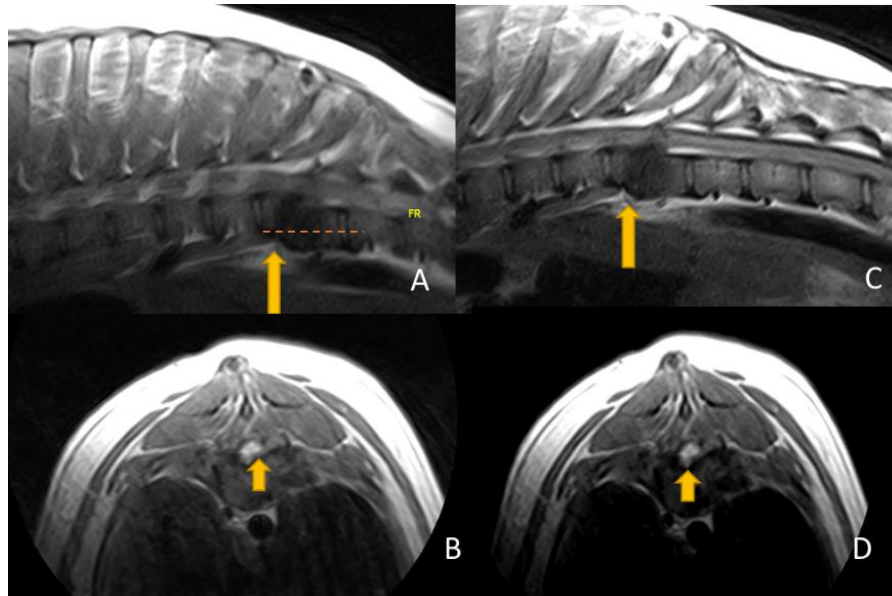


Figura 3-14. RM paciente 7. A) Sagital T1 pretrasplante se observa falta de alineación entre las vértebras T8-T9 con descenso del piso del canal caudal por listesis ventral de T9 (línea punteada). El cuerpo de T8 presenta listesis hacia la izquierda condicionándose por esta alteración posicional una estenosis del canal medular. En C sagital T1 postrasplante sin cambios. En B axial T1 pretrasplante y D axial en T1 postrasplante estenosis del canal.

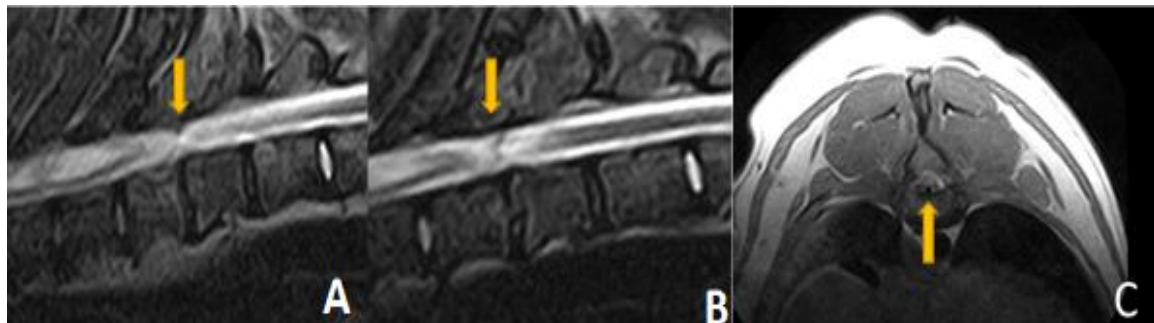


Figura 3-15. RM paciente 8. A) Sagital T2 pretrasplante Se aprecia marcada protusión discal del espacio T9-T10 en posición dorso centro lateral derecha, que deforma el saco dural, apreciándose saturación de la señal del parénquima medular como consecuencia de la presencia de edema (Flecha amarilla). En B sagital T2 postrasplante sin cambios aparentes. En C axial en T1 pretrasplante se observa la compresión medular a nivel T9-T10.

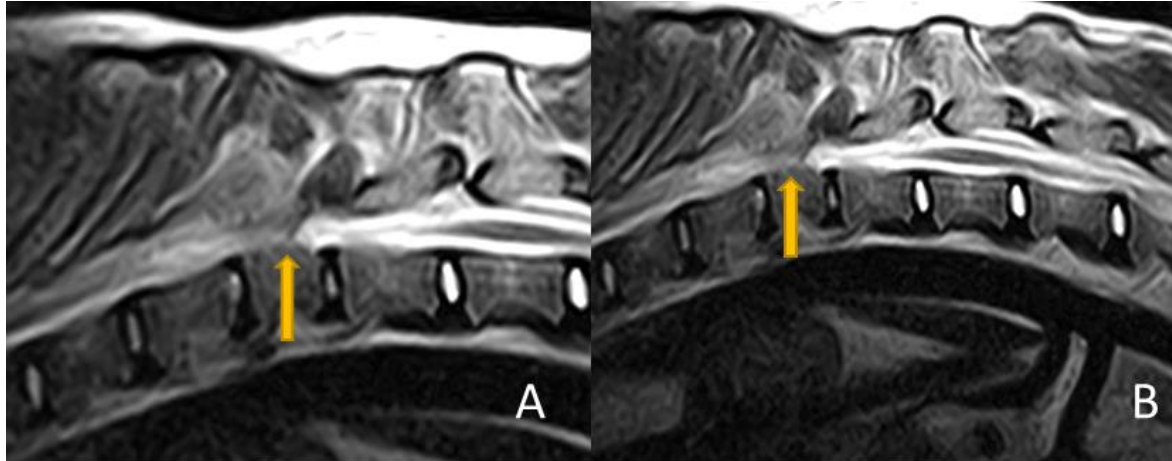


Figura 3-16. RM paciente 9. En A sagital en T2 pretasplante el espacio T10-T11 presenta severa estenosis del canal y alteración de la alineación articular que podría corresponder a la presencia de hemivértebra y/o a secuela traumática. El parénquima medular presenta en ese sector cambios de señal de tipo degenerativo. En B sagital T2 posttrasplante no se observan cambios significativos.

En la tabla 3-9 se presenta un resumen de algunas lesiones que pueden ocurrir de manera secundaria después de trasplante medular como hemorragia reciente, inflamación, infección, aumento de cavidad y finalmente la presencia de tumores. Estas lesiones no se vieron en ninguno de los pacientes, por tanto, esta prueba nos confirma que el trasplante medular de CGEO es seguro.

Tabla 3-9. Resumen de las conclusiones derivadas de la comparación de las imágenes de resonancia magnética pre y post de los pacientes sometidos al trasplante

SUJETO	HEMORRAGIA RECIENTE	INFLAMACION	INFECCION	AUMENTO DE CAVIDAD	PRESENCIA DE TUMORES	SEGURIDAD
1	NO	NO	NO	NO	NO	SI
2	NO	NO	NO	NO	NO	SI
3	NO	NO	NO	NO	NO	SI
4	NO	NO	NO	NO	NO	SI
5	X	X	X	X	X	X
6	NO	NO	NO	NO	NO	SI
7	NO	NO	NO	NO	NO	SI
8	NO	NO	NO	NO	NO	SI
9	NO	NO	NO	NO	NO	SI

4. Discusión

El uso de caninos con enfermedades de ocurrencia natural es una opción muy atractiva que nos permite desarrollar estrategias regenerativas basadas en células como es el caso específico de la lesión medular crónica, ya que modelan de manera muy similar la heterogeneidad de una cohorte de pacientes clínicos y las alteraciones estructurales y funcionales ocurridas en humanos (Olby et al., 2004; Jeffery et al., 2005; Lim et al., 2007; Granger et al., 2012; McMahill et al., 2015; Tamura et al., 2015; Wu et al., 2018). Los resultados de este estudio están asociados a mejoras en la sensibilidad y actividad motora de pacientes caninos con lesión medular crónica. Esta investigación de trasplante de CGEO no purificadas de la mucosa olfatoria canina que pasa del modelo de rata en donde ya se han obtenidos resultados alentadores en modelos animales (Ramon-Cueto et al., 2000; Lu et al., 2001; Richter et al., 2005; Botero., 2015; Khankan et al., 2016) a una cohorte de pacientes con lesión medular crónica de ocurrencia natural, la que nos permitió establecer que hay efectos positivos en la realización de este tipo de trasplante y que dichos efectos indujeron cambios en la actividad sensitiva y motora de los miembros posteriores en los pacientes sometidos al trasplante a pesar de la condición crónica en dichos pacientes.

4.1 Toma de muestra y cultivo de CGEO

Para la toma de la muestra de MO los escasos estudios clínicos de trasplante de CGEO en caninos, reportan técnicas de toma de muestra invasivas que muchas veces pueden dejar secuelas. Consisten principalmente en incisión de huesos nasal y frontal para tomar la muestra de bulbo olfatorio y el acceso quirúrgico al seno frontal para tomar muestra de mucosa del seno y mucosa olfatoria nasal caudal. (Granger et al., 2012). Nosotros probamos aquí una nueva técnica, la de la toma con guía endoscópica, la cual demostró además de ser segura para los pacientes y no dejar secuelas, ser una muy buena opción para obtener una suficiente cantidad de tejido para el cultivo primario de las CGEO.

Los resultados de la estandarización del cultivo de CGEO nos indicaron que el protocolo (Botero., 2015), ya probado para células derivadas de rata, no tuvo los resultados esperados en tejidos obtenidos de canino y que fue necesario modificarlo para poder obtener una buena población. Ya estandarizado el cultivo pudimos verificar que en los dos primeros pasos del método quedan adheridas al plástico algunas células mesenquimales y posiblemente fibroblastos. En el tercer paso del cultivo en donde ya se obtienen las CGEO pudimos advertir que las células obtenidas también eran heterogéneas en forma y al realizar el conteo celular cualitativo la población de CGEO este estuvo entre el 30 y 50%. Estos datos son difíciles de comparar con los reportes de literatura ya que los porcentajes de CGEO obtenidos en cultivo primario son muy variados. Por ejemplo, Ito y cols., 2006, refieren que en los cultivos primarios de 21 días de mucosa olfatoria canina obtuvieron un 40 % de CGEO (Ito et al., 2006)., mientras que Ramón-Cueto y Nieto-Sampedro mencionan que el porcentaje obtenido en cultivo primario de rata, fue del 90% (Ramon-Cueto and Nieto-Sampedro, 1994) y Nash y cols., 2001 también en mucosa nasal de rata describieron cultivos de 93.2% de CGEO (Nash et al., 2001) En cultivos primarios de tejido de caninos Jeffery y cols., 2005 reportaron obtener una proporción de 70% de CGEO de bulbo olfatorio, mientras que Granger y cols., 2012 consiguieron un 50% de CGEO de mucosa del seno frontal y mucosa de la cavidad nasal caudal. Estas variaciones reportadas pueden deberse a diversos factores entre los que están la especie animal, la edad de los animales, la técnica de cultivo ejecutada, la cantidad del tejido procesado, los constituyentes del cultivo tanto en concentración como en variedad de los mismos (Botero., 2015) características que pudieron influir en nuestros resultados. Es decir, los resultados de cultivos celulares reportados para roedores no pueden ser extrapolados para cultivos en caninos y posiblemente tampoco para cultivos de células humanas. Puntualmente por ejemplo en los primeros ensayos de cultivo no se utilizó el mitógeno forskolina y se observó muy poco crecimiento celular, al incluir la forskolina (dos micro moles) se obtuvo un aumento notable del número de células. En nuestro cultivo no fue posible incluir neuregulina 1 (20 ng/ml), recomendado por Jeffery y cols., 2005 y Granger y cols., 2012, dado que no fue posible ubicar un proveedor de este reactivo en Colombia. La neuregulina 1 es una proteína que hace parte de la familia del factor de crecimiento epidermal, que posiblemente al ser utilizada nos hubiera proporcionado un mayor número de células.

En el estudio clínico optamos por realizar un trasplante de cultivo celular primario CGEO de MO, sin purificación. Este tema ha sido de amplio debate, en lo que se refiere a los tratamientos de terapia celular, en especial con las CGEO, ya que se encuentran estudios tanto de modelo animal, como clínicos con trasplante de mucosa olfatoria con y sin purificación de las CGEO, que reportan efectos positivos, en recuperación motora y regeneración axonal. Por ejemplo, Ramón-Cueto y Nieto Sampedro, 1994, describieron que el trasplante de CGEO puras en el modelo de rata indujeron regeneración axonal de los axones de la raíz dorsal en una médula espinal rizotomizada (Ramón-Cueto y Nieto-Sampedro, 1994). Así mismo los estudios de Smale y cols, en modelos de trasplante en rata, corroboraron la elongación axonal en el cerebro de ratas adultas después de la sección de la fimbria-fórnix (Smale et al., 1996). Por otra parte diversos estudios como el de Li et al., 1997 presentan el efecto positivo de los cultivos primarios no purificados. Estos investigadores pudieron comprobar que cuando trasplantaron estas células en modelo de rata con sección unilateral de tracto corticoespinal a nivel cervical reconocieron la formación de un puente continuo en dicho tracto, donde los axones crecieron a través del trasplante permitiendo a los animales trasplantados recuperar la movilidad del miembro afectado (Li et al., 1997). En 1998 otro estudio de Ramón cueto y cols., reportó la regeneración axonal de 1,5 cm en la médula espinal de modelo de rata con LM completa y trasplante de CGEO no purificadas (Ramon-Cueto and Avila, 1998). Es decir que cultivos con CGEO purificadas y no purificadas han dado igualmente resultados positivos en diversos trasplantes. Igualmente se han demostrado excelentes resultados trasplantando la mucosa olfatoria completa en sección espinal en ratas. Lu y cols 2001 quienes mediante análisis histológico demuestran regeneración de vías descendentes y la restauración parcial de la función (Lu et al., 2001). En un estudio de trasplante de mucosa olfatoria en ratas con sección del nervio facial se concluyó que este trasplante mejoró significativamente la regeneración nerviosa reduciendo el porcentaje de ramificación de motoneuronas y mejorando la precisión de la reinervación (Guntinas-Lichius et al., 2002). Estos cultivos pueden contener células de Schwann de nervios periféricos, difíciles de diferenciar de las CGEO, y que se ha demostrado que también promueven regeneración axonal, remielinización (Santamaría et al., 2018). Adicionalmente, Lindsay y cols., recomiendan utilizar la MO completa para el trasplante dado que realmente se desconoce la dinámica molecular existente entre los diferentes tipos celulares que se encuentran naturalmente en la mucosa olfatoria in situ y que podrían jugar algún papel en el desempeño del trasplante (Lindsay et al., 2010). Los

estudios clínicos de trasplante medular en caninos también utilizaron cultivos primarios de MO o BO no purificados, y obtuvieron una mejora significativa en la función motora (Granger et al., 2012). Por lo expuesto anteriormente y como lo demuestran las pruebas de valoración de nuestros pacientes, sugerimos que el trasplante aquí utilizado, obtenido de un cultivo primario de CGEO no purificado, es una muy buena opción para el tratamiento de terapia celular en pacientes con LM.

En nuestro caso este trasplante con el número de células utilizado, ofreció una mejoría en la función sensitiva y motora en diversos grados. Se han sugerido diversos mecanismos por los cuales los trasplantes celulares inducen la regeneración axonal, neuronal y la remielinización, que resulta en la recuperación de algunas funciones sensoriales y motoras en los pacientes trasplantados. Parece ser que uno de los mecanismos más probables es el efecto paracrino a través de la síntesis de diversos factores de crecimiento NGF, BDNF y las NT 3 y 4 entre otras (Boruch et al., 2001; Huang and Reichardt, 2003; Kumar et al., 2005). Por estas razones podríamos proponer que el número de células a trasplantar no es un factor muy importante en las terapias y por ello los investigadores han probado efectividad de los tratamientos con tan diversos porcentajes celulares.

4.2 Técnica de trasplante

Este estudio probó por primera vez un nuevo procedimiento para el trasplante autólogo intramedular de CGEO, la técnica eco guiada de la aguja espinal intramedular. Esta permitió visualizar claramente el paso de la aguja a través de la musculatura epiaxial y su profundización en los tejidos (aproximadamente 1.8 cm desde la superficie), hasta llegar a un punto cercano a la lámina vertebral donde ya no era posible observarla, dando una percepción de profundidad y ubicación para finalmente sentir el momento en que la punta de la aguja perfora el ligamento intervertebral, lo que aseguró que habíamos alcanzado el canal vertebral y dio la seguridad para inyectar las células del trasplante. Un procedimiento similar fue utilizado por Granger et al 2012 con la variante de guía para ubicación de la aguja con la utilización de fluoroscopia para asegurar completamente la correcta ubicación de la aguja. Esta técnica es más precisa ya que nos permite ver la ubicación de la aguja en tiempo real en el tejido medular. Con la guía ecográfica utilizada en el presente estudio pudimos evitar primero que todo una técnica con abordaje

quirúrgico (laminectomía), utilizada por, (Jeffery et al., 2005; Penha et al., 2014; Feitosa et al., 2017), segundo salvar el obstáculo de no tener a la mano el fluoroscopio y evitar la radiación para los pacientes y el personal de la sala de cirugía. Por lo anterior podemos concluir que la técnica de guía ecográfica utilizada por nosotros por vez primera en este tipo de investigación fue lo suficientemente práctica, segura y eficaz en la guía del paso de la aguja por los tejidos de los pacientes y nos permitió un muy buen acceso al canal medular e inyectar las células trasplantadas en el lugar preciso seleccionado con anterioridad mediante resonancia magnética, es decir que esta técnica puede ser utilizada con confianza y seguridad en este tipo de intervenciones a futuro.

En el momento del trasplante nosotros inyectamos un volumen de 400 microlitros de suspensión celular en medio (que contenían 10^6 células), en el sitio de lesión, en dos profundidades uno abajo y otro arriba en la médula espinal (200 ml) en cada uno a diferencia de Jeffery y cols., 2005 quienes inyectan cinco millones de células mediante laminectomía dorsal y mielotomía media sagital en diez inyecciones de 100 microlitros cada una directamente en el parénquima medular en múltiples puntos, en sesenta segundos para cada inyección (Jeffery et al., 2005). En otra investigación Feitosa y cols., 2017 trasplantaron células madre de pulpa dental inmadura humana en perros con lesión medular, un millón de células en un volumen de trescientos microlitros, realizaron hemilaminectomía e inyectaron las células directamente en el tejido medular en tres puntos, craneal, caudal y en el centro de la lesión. (Feitosa et al., 2017). Penha y cols., 2014, hicieron trasplante de células madre derivadas de la médula ósea en perros con LM, realizaron hemilaminectomía y entregaron un millón de células directamente a la médula espinal. La técnica de trasplante empleada en esta investigación fue realizada en corto tiempo (diez minutos) con buena precisión, mínimamente invasiva, (inyección percutánea), bastante segura y no presentó efectos adversos durante ni después de la misma lo que nos permite aseverar que es idónea en este tipo de procedimientos.

4.3 Evaluación funcional

Los resultados de esta investigación muestran que el trasplante de CGEO está asociado a mejoras sensitivas y motoras, en casos clínicos de lesión medular traumática crónica en caninos, un estado en donde es muy difícil observar recuperación con las terapias convencionales.

La escala Olby de puntuación de la marcha fue usada en este estudio para evaluación cuantitativa de los resultados funcionales. Esta escala se basa en la escala de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) para roedores (Basso et al., 1995). La escala Olby al presentar cinco estados cada uno dividido en tres puntajes nos permitió discriminar de una manera amplia las diferentes condiciones en que se encontraban los pacientes en el momento de evaluar su marcha, permitiéndonos realizar una clasificación bien diferenciada en los estados pretrasplante y en las tres evaluaciones mensuales realizadas postrasplante. Tiene la ventaja de proporcionar una forma de cuantificar el progreso en la deambulación que en un entorno clínico es el entorno más relevante (Olby et al., 2001). Con el aumento de trabajos de investigación en el área de lesión medular en caninos muchos investigadores han confirmado la seguridad y confianza brindada por esta escala en este tipo de trabajos (Olby et al., 2004; Lim et al., 2007; Jung et al., 2009; Ryu et al., 2009; Park et al., 2012; Penha et al., 2014; Sarmiento et al., 2014; Feitosa et al., 2017; Wu et al., 2018). podemos decir entonces que la escala Olby se ha posicionado como una escala a tener muy en cuenta debido a su incrementado uso por investigadores de diversas partes del mundo quienes la usan con toda confianza. Por lo anteriormente expuesto consideramos el uso de dicha escala en nuestra investigación.

Nuestro estudio nos permitió demostrar el valor de utilizar los caninos con lesión medular crónica de ocurrencia natural como modelo en trasplante celular de mucosa olfatoria. En este caso vimos que es factible obtener la muestra de tejido directamente de la mucosa nasal, que es seguro, que el trasplante no generó daños a corto ni mediano plazo y que además produjo resultados significativos tanto en el resultado del examen neurológico como en la marcha, como lo reportado por Jeffery et al., 2005, Granger et al., 2012. Este trabajo provee información que podrá ser útil y nos anima a sugerir la posibilidad de iniciar estudios de este tipo de procedimientos en pacientes humanos.

Los resultados obtenidos mediante el examen neurológico en las variables de sensibilidad fueron significativos en el segundo y tercer mes mediante la prueba de los signos. Es decir, hubo cambios en la sensibilidad superficial en los dermatómeros safeno, peróneo y tibial y en la sensibilidad profunda, aquella información transmitida por fascículos espinotalámicos y el fascículo propio respectivamente, lo cual nos indica que posiblemente estas vías de transmisión ascendentes se regeneraron. En las pruebas de propiocepción general y reacciones posturales no se presentaron cambios significativos

mediante el test de los signos en ninguno de los tiempos medidos. Para que existan cambios en estas pruebas es necesario que se dé una mejora en las vías ascendentes propioceptivas, es decir en el fascículo gracilis (propiocepción consciente) y espinocerebelar dorsal y ventral (propiocepción inconsciente) y descendentes motoras tracto cortico espinal lateral (movimiento voluntario) de las vías piramidales y tractos vestibulo espinal, rubroespinal de las vías extrapiramidales, lo suficientemente amplias en magnitud. Sin embargo, algunos pacientes mejoraron individualmente en las variables de propiocepción y reacciones posturales lo que les permitió desempeñarse mejor en la marcha.

En la evaluación de la marcha encontramos resultados significativos en el primero, segundo y tercer mes mediante el test de los signos. Este resultado parecería ir en contra de lo evidenciado en los resultados de las pruebas de propiocepción y reacciones posturales, ya que estas no fueron significativas. Esto lo podemos explicar debido a que muy posiblemente la mejora en la marcha se haya debido a ajustes en circuitos medulares locales (vías propioespinales) que permiten producir patrones de actividad motora independientemente del control motor superior. Es decir que el trasplante pudo ejercer efectos positivos que se tradujeron en reconexiones de vías locales y no en la regeneración de vías de tracto largo (Granger et al., 2012), estos autores quienes mediante evaluación de la marcha y medidas de resultado secundario como potenciales evocados somatosensoriales, potenciales motores magnéticos transcraneales y la distensibilidad de vejiga urinaria concluyeron que no existe evidencia de mejora en las conexiones funcionales del tracto cortico espinal. En nuestro estudio seis pacientes presentaron cambios de puntaje ascendentes en la escala olby, dos sujetos iniciaron con puntaje de 0 en pretrasplante, uno se mantuvo sin cambios hasta el tercer mes postrasplante debido a una afección medular generalizada y el otro paciente pasó de 0 a 1 en esta escala, es de anotar que presentó luxofractura a nivel T12-T13 con duración de siete meses y sin corrección quirúrgica. Tres pacientes iniciaron el estudio en puntaje 1 pasando a puntajes 4, 5, y 6 a los tres meses postrasplante. Dos iniciaron en tres, de estos uno se mantuvo estable y el otro alcanzó puntaje de 9, y un paciente inició con puntaje de 8 y llegó a 12. Es decir, aproximadamente el 75 % de los pacientes presentaron algún grado de recuperación progresiva en el tiempo que varió entre los sujetos luego de tres meses de seguimiento.

Según el estudio de Botero 2015 se pudo demostrar que las lesiones espinales secundarias influyen negativamente en el desempeño funcional de los animales por lo que se recomienda la estabilización de la lesión antes del trasplante. En el trabajo de Jeffery y cols., 2005, seis de un total de ocho pacientes fueron sometidos a cirugía previa al trasplante de los cuales siete presentaron cambios ascendentes en los puntajes de la escala BBB. En nuestra investigación ningún animal fue sometido a estabilización y aun así presentaron mejorías lo cual nos indica el posible buen efecto terapéutico del procedimiento, que podría mejorar probablemente si se realiza estabilización espinal antes del trasplante. El seguimiento realizado en nuestros pacientes se llevó a cabo mensualmente por tres meses, sería importante que en estudios futuros este se ampliara a seis o más meses para documentar si los cambios presentados se mantienen o aumentan.

Por lo anterior podemos deducir que el trasplante autólogo de células de la mucosa olfatoria en casos clínicos de lesión medular crónica en caninos produce efectos significativos evidenciables mediante el examen neurológico de sensibilidad, reflejos e indudablemente mediante la evaluación de la marcha, sin que ello signifique una recuperación de la actividad motora voluntaria. Pensamos que como la disfunción medular está producida por varias alteraciones como demielinización de axones, degeneración axonal, formación de cavidad, cicatriz glial y moléculas que generan un medio inhibitorio para la regeneración axonal, un enfoque multivariado debe ser necesario para intentar obtener mejores resultados en la búsqueda del tratamiento efectivo que les permita a los pacientes que padecen lesión medular obtener una cura a este lamentable padecimiento. También es de suma importancia la posibilidad de llevar a cabo este trasplante y de someter a los individuos a un plan estratégico de terapia física para complementar el tratamiento dado el desarrollo e implementación de esta disciplina en la medicina veterinaria y el impacto que podría tener su implementación en la calidad de vida de los pacientes.

La realización de este tipo de trasplante celular en casos clínicos posee algunas limitaciones como la obtención de información derivada de estudios histológicos que obviamente son imposibles de realizar en los pacientes y por tanto no podemos dar conclusiones directas con respecto a los beneficios reales o no en los tejidos y su relación con los efectos positivos o negativos en la clínica de los pacientes. Igualmente

(Penha et al., 2014) reportan la misma limitación al utilizar trasplantes autólogos de células madre mesenquimales. en casos clínicos de lesión medular en caninos. Luego del trasplante pudimos evidenciar que ninguno de los pacientes desarrollo alteraciones en la región intervenida ya que no presentaron cuadros locales de dolor, fiebre, inflamación o infección y tampoco presentaron alteraciones generalizadas, por lo que aseguramos que el procedimiento es seguro.

4.4 Resonancias magnéticas

Aunque los animales mostraron mejorías clínicas en esta investigación, las imágenes de resonancia magnética tomadas tres meses posteriores al trasplante no permitieron observar cambios positivos que evidenciaran dicha mejoría, no obstante, tampoco cambios negativos luego del trasplante, lo que indica que la técnica de inyección percutánea propuesta por nosotros es segura. Lim y cols., 2007 reportan hallazgos similares luego del trasplante de células madre mesenquimales derivadas de sangre de cordón umbilical canino en lesión medular inducida experimentalmente, las imágenes fueron tomadas al mes y a los dos meses luego del trasplante (Lim et al., 2007). Sarmiento et al., 2014 reportan que luego del trasplante de células madre de médula ósea como tratamiento para perros con lesión medular crónica las imágenes de resonancia magnética reportan los mismos hallazgos imagenológicos a los 90 días postrasplante que a los previos al procedimiento (Sarmiento et al., 2014). Feitosa y cols., 2017 quienes inyectaron células madre humanas de pulpa dentaria en casos de lesión medular crónica en caninos, con la diferencia de que la toma de resonancia la realizaron 60 días postrasplante y en nuestro caso a los 90 días (Feitosa et al., 2017) tampoco pudieron visualizar en las imágenes cambios tan pronunciados como para concluir la posibilidad de un efecto positivo en los tejidos. Se pensaría que tal vez en períodos de tiempo cortos luego de un trasplante celular sería muy poco probable visualizar cambios positivos que evidenciaran mejoras en los tejidos mediante imágenes de resonancia magnética, entonces sería de esperar que en tiempos más largos posteriores al trasplante dichas imágenes permitieran evidenciar cambios positivos en los tejidos. Sin embargo, Mackay y cols., 2008, reportan que las imágenes de resonancia magnética (IRM) a los 3 años en humanos trasplantados con CGEO no mostraron cambios con respecto a las IRM preoperatorias o las IRM intervinientes a 1 y 2 años, sin evidencia de ningún tumor de células introducidas y sin desarrollo de siringomielia postraumática u otros hallazgos

radiológicos adversos (Mackay-Sim et al., 2008). Por lo anterior podemos decir que las imágenes de resonancia magnética en casos de trasplante de células intramedular no permiten observar cambios significativos positivos aún en lapsos largos ya que estos seguramente son debidos a relaciones microscópicas que pueden surgir y que a todas luces distan de permitir visualizar cambios en imágenes macroscópicas, además debemos tener en cuenta que en el estudio de Mackay et al., 2008 de un total de tres pacientes de los trasplantados tan solo uno consiguió una leve mejoría en la sensibilidad táctil bilateral en extremidades inferiores, es decir la mejora fue mínima como para mostrar algún cambio significativo en las imágenes de resonancia, además de tener una muestra muy pequeña. Lo que sí pueden informar las imágenes es la presencia o ausencia de posibles daños causados debido al procedimiento, como hemorragias, absesos, tumores, o inflamación que por sus dimensiones o contrastes puedan ser observados, hallazgos estos ausentes en los estudios mencionados anteriormente (Lim et al., 2007; Mackay-Sim et al., 2008; Sarmiento et al., 2014; Feitosa et al., 2017).

Este primer trabajo llevado a cabo en pacientes caninos con lesión medular crónica en nuestro país, nos permite tender un puente importante entre el laboratorio y la clínica con miras a la implementación de pruebas mejor diseñadas en pacientes humanos destacando su importancia en el aspecto traslacional pues hemos trabajado con un grupo de pacientes con lesión medular de ocurrencia natural y no con lesión ocasionada en el laboratorio, lo cual nos acerca más a la realidad de la clínica humana.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El trasplante autólogo de CGEO en casos clínicos de lesión medular crónica en caninos ejecutada a través de inyección percutánea eco guiada, demostró ser un procedimiento factible, seguro y eficaz, y que además produjo algunos efectos clínicos benéficos en los pacientes.

La toma de muestra de mucosa olfatoria de cavidad nasal caudal vía endoscópica realizada por vez primera en esta investigación, demostró ser un procedimiento factible, seguro y eficaz para los propósitos del cultivo y del trasplante, además de no generar efectos adversos a corto ni mediano plazo en los pacientes.

El cultivo primario obtenido de la mucosa olfatoria de la cavidad nasal caudal permitió obtener porcentajes de CGEO que variaron de 30% a 50%, los cuales pueden llegar a ser mejorados adicionando mitógenos.

La técnica de trasplante percutánea con guía ecográfica de CGEO implementada por vez primera en nuestro estudio, permitió un acceso sencillo, preciso, mínimamente invasivo y seguro al tejido medular sin generar efectos secundarios en los pacientes sometidos al trasplante.

El trasplante de CGEO no purificado evidenció mejorías en el desempeño de los pacientes al examen neurológico en sensibilidad y desempeño de la marcha, convirtiéndose en un ejemplo más de la respuesta a este tipo de trasplante de CGEO no purificadas en pacientes caninos con lesión medular crónica.

La comparación de las imágenes de resonancia magnética pre-trasplante vs post-trasplante en este estudio no permitieron evidenciar mejoras en el área afectada, pero sí aportaron información valiosa con respecto a la ausencia de lesiones que se hubieran podido ocasionar a causa del trasplante lo cual nos permite deducir, que el trasplante fue seguro y que este tipo de imágenes es idónea para localizar la lesión, dimensionarla y permitir decidir el lugar preciso del trasplante.

Este trasplante representa un tratamiento prometedor en pacientes caninos con lesión medular crónica, sin embargo, otro tipo de células y fuentes alternas pueden ser tenidas en cuenta para ser usadas en este tipo de tratamientos, sugiriendo que serán necesarias nuevas pruebas clínicas con pacientes.

5.2 Recomendaciones

Los pacientes caninos con lesión medular traumática crónica que vayan a ser sometidos a este tipo de trasplante, idealmente deberán ser sometidos a estabilización quirúrgica de las lesiones en los casos que los ameriten, pues esta medida posiblemente incremente las probabilidades de obtener mejorías.

Junto con la realización del trasplante de CGEO sería conveniente programar los pacientes con planes definidos de terapia física pues consideramos que el solo trasplante no es suficiente ya que es necesario activar la musculatura y las articulaciones que por el tiempo transcurrido se encuentran atrofiadas.

Sería conveniente realizar controles neurológicos en tiempos más prolongados que los realizados por nosotros por ejemplo, a seis meses o más y obtener más información con respecto a la evolución de los pacientes.

Consideramos importante poder desarrollar un estudio a doble ciego aleatorizado, pero el inconveniente estaría en el dilema ético de utilizar pacientes caninos que serían sometidos a procedimientos quirúrgicos bajo anestesia general que pertenecerían al grupo control e inyectados con placebo y que eventualmente no se verían beneficiados del tratamiento.

Es de suma importancia generar trabajos de investigación que nos permitan conocer más la dinámica celular entre las diferentes poblaciones celulares implicadas en este tipo de trasplantes, su entendimiento permitirá definir nuevas alternativas de tratamientos para esta desastrosa afección.

Por los resultados obtenidos en este trabajo consideramos que es importante implementar estudios de estas células en la especie humana para ir adelantando la comprensión y desempeño de este tipo de trasplante como parte de las estrategias para intentar solucionar esta devastadora y penosa afección.

Anexo 1: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN DE CANINOS EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EFECTO DEL TRASPLANTE AUTOLOGO DE CELULAS DE LA GLIA ENVOLVENTE OLFATORIA EN CASOS CLINICOS DE LESION MEDULAR EN CANINOS

Yo: _____ identificado con cc _____ con domicilio

He sido informada(o) de que:

Mi mascota: _____

Especie: _ _____

Raza: _____

Edad: _____

Sexo: _____

ha sido invitada a participar en este estudio dado que cumple con los requisitos pre establecidos. Por tanto estoy informado de los siguientes aspectos de la investigación:

INFORMACION GENERAL

Somos investigadores de la Universidad Nacional de Colombia de las Facultades de Medicina y Medicina Veterinaria. Estamos investigando sobre nuevas terapéuticas para tratar la lesión medular. El propósito de la investigación es evaluar en caninos con lesión medular traumática si el trasplante de células de la mucosa nasal del mismo paciente produce efectos benéficos para él, es decir si los animales mejoran su condición o no.

Esto lo podemos evaluar observando mejoras o no en cuanto a su capacidad para sentir dolor y/o para moverse con sus miembros posteriores.

De obtener resultados positivos esto sería de enorme interés para la comunidad científica ya que daría luces sobre el camino a seguir para tratar esa condición en humanos.

TIPOS DE INTERVENCION

Estoy informado de que será sometida a las siguientes intervenciones:

1- Toma de imágenes diagnósticas (resonancia magnética). Esta toma se realizará bajo anestesia general y puede tener riesgo de paro cardiorespiratorio con muerte del animal y/o reacciones inesperadas de idiosincrasia.

2- Toma de biopsia nasal, para cultivo primario de células de la glía envolvente (CGEO) las cuales se utilizarán para trasplante autólogo. Se realizará bajo anestesia en conjunto con la toma de imágenes diagnósticas. La mascota presentará un leve sangrado que no implica mayores consecuencias

3- Trasplante de CGEO. Se realizará bajo anestesia general. Además de los riesgos expuestos para la anestesia, los riesgos de inflamación y/o dolor en el área intervenida, hemorragia e infección.

4- Los pacientes serán evaluados mediante examen médico general y evaluación neurológica mensualmente. Esta evaluación no tiene ningún riesgo.

Todos los procedimientos serán realizados por profesionales médicos veterinarios

DURACION DEL PROYECTO

Aproximadamente entre 4-6 meses. Durante ese tiempo es necesario el propietario se desplaza a las Clínicas Veterinarias para para realizar los procedimientos descritos.

Los estudios llevados a cabo anteriormente informan que los procedimientos han sido seguros y no han presentado efectos secundarios debido a dicho trasplante.

Si debemos tener en cuenta las reacciones de idiosincrasia que puedan llegar a presentarse.

RIESGOS

Los caninos serán sometidos a procedimientos mínimamente invasivos y moderadamente invasivos, de manera que el participar en esta investigación se expone a un riesgo mayor que si no lo hiciera. Tampoco sabemos si la condición mejore o no.

Trataremos de disminuir las posibilidades de los riesgos que se puedan presentar pero si algo inesperado ocurre le proporcionaremos los cuidados necesarios para minimizar las posibles consecuencias.

MOLESTIAS

Es posible que sienta molestias en los casos de tomas de muestras o traslados a la clínica y de vuelta a casa. ESTOS RIESGOS DEBEN INCLUIRSE EN CADA UNO DE LOS PROCESOS.

BENEFICIOS

Los caninos se beneficiarán de los cuidados y atención médica Veterinaria durante el estudio.

Si obtenemos resultados que nos permitan concluir mejoras en la condición clínica de los participantes, obviamente estos serán los primeros beneficiados, tendremos a la mano una terapéutica novedosa para tratar esa condición (lesión medular traumática) que podría ser prometedora para los demás caninos y de paso un avance que permitiría empezar a realizar estudios orientados hacia los humanos.

DERECHO A NEGARSE O A RETIRARSE

Su canino no tiene por qué hacer parte de esta investigación si usted no lo desea. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento, es su elección y sus derechos serán respetados.

A QUIEN CONTACTAR

Si tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente que mi mascota participe en esta investigación, entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento.

Nombre del Participante _____

Firma del Participante _____ **Fecha** _____

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente. **Nombre del Investigador** _____ **Firma del**

Investigador _____

Fecha _____ **Día/mes/año**

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado _____ **(iniciales del investigador/asistente).**

Anexo 2: Registro Crevet



Avenida Calle 127 # 70D - 80
Tel: (1) 639 2364 - Barrio Niza Norte
Bogotá - Colombia

REGISTRO DE INGRESO N° 9759

Particular Entidad Fecha: ___/___/___

Identificación del Propietario

Nombre del propietario: _____ C.C. C.E. T.A. Pasaporte # _____
Dirección: _____ Teléfonos: _____

Identificación del Paciente: **Estudios previos a entregar:**

Nombre del paciente: _____ Cuadro hemático ALT Otros
Raza: _____ Edad: _____ Creatinina Remisión

CABEZA

<input type="radio"/> Cráneo	<input type="radio"/> Neurocráneo	<input type="radio"/> Encefalo	<input type="radio"/> Silla Turca		* Se recomienda en este caso especificar la estructura anatómica deseada para realizar los tests.
			<input type="radio"/> Oídos		
			<input type="radio"/> Orbitas		
	<input type="radio"/> Esplancocráneo	<input type="radio"/> Senos paranasales			** El esplancocráneo incluye todos los estructuras mencionadas no hay necesidad de especificar.
		<input type="radio"/> Cara			
		<input type="radio"/> Cavidad			
		<input type="radio"/> Nasal			
		<input type="radio"/> Cavidad oral			
		<input type="radio"/> Mandíbula			

RESONANCIA DE COLUMNA

COLUMNA			
	Desde	Hasta	
<input type="radio"/> Cervical	Base del Cráneo	T2	
<input type="radio"/> Cervico Toraxica	C3	T3	
<input type="radio"/> Toraxica	C7	L1	
<input type="radio"/> Toraco Lumbar	T10	L3	
<input type="radio"/> Lumbo Sacra	T12	Sacro	

RESONANCIA DE MIEMBROS

MIEMBROS ANTERIORES		IZQUIERDO	DERECHO
<input type="radio"/> HOMBRO			
<input type="radio"/> CODO			
<input type="radio"/> MANO -CARPO			
MIEMBROS POSTERIORES		IZQUIERDO	DERECHO
<input type="radio"/> CADERA			
<input type="radio"/> RODILLA			
<input type="radio"/> TARSO			

Médico que indica el estudio

Motivo de la resonancia

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ANESTESIA GENERAL

Fecha: Bogotá D.C. No _____

Ref. Consentimiento Informado.

Yo _____ identificado(a) con Cedula de Ciudadanía Numero _____ expedida en _____

Certifico mediante la suscripción del presente documento, que he sido informado(a) sobre los riesgos a los que puede estar sometida la mascota de Nombre _____ Especie _____ Raza _____ Sexo _____ Edad _____ Peso _____ de mi propiedad (en adelante el "Paciente"), al cual se le realizará Anestesia General para el procedimiento de Resonancia Magnética en la región: _____ este examen diagnóstico se llevará a cabo en la ciudad de Bogotá D.C. departamento de Cundinamarca.

Con la suscripción del presente documento autorizo la realización de los siguientes actos médicos al Paciente:

- a. Anestesia General durante el tiempo del procedimiento: La misma se llevará a cabo con última tecnología, mínima invasión y frente a esta pueden presentarse efectos adversos como: convulsiones, sueño profundo, hipotensión, hipotermia, coma, cambios hemodinámicos, paro cardíaco y/o respiratorio, tanto en la premedicación, inducción y/o mantenimiento anestésico que pueden poner en riesgo la vida del Paciente. Cabe aclarar que la probabilidad de ocurrencia de estos eventos están sujetos al estado clínico y/o idiosincrasia farmacológica de cada paciente.

Nota: En caso de que el estudio requiera medio de contraste se debe tener en cuenta los posibles efectos nefrotóxicos.

Así mismo autorizo al Centro de Resonancia Especializada en Veterinaria CREVET y/o Esaote de Colombia Ltda. a realizar dicho procedimiento asumiendo los riesgos informados que de este se derivan, y en caso de presentarse efectos adversos, los eximo de toda responsabilidad disciplinaria, legal, civil y/o penal con respecto a el Paciente reseñado en la realización del mismo.

También autorizo que en caso de que mi mascota entre en Paro cardio-respiratorio se proceda a realizar la correspondiente maniobra médica de emergencia.

En Constancia de lo anterior Firmar:

C.C.
Propietario, Acudiente y/o persona responsable

Avenida Calle 127 #70D-80, Teléfono: (1)6392364
Barrio Niza Norte, Bogotá - Colombia

Anexo 3: Tabla de resultados originales

SUJETO N°1		Pretrasplante	Primer mes post	Segundo mes post	Tercer mes post
PROPIOCEPCION	Colocación visual y <u>táctil</u>	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Nudillos	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Profunda	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
DERMATOMEROS	Safeno	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	<u>Peróneo</u>	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Tibial	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
MIXTAS	Salto sobre una <u>ext</u>	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Extensor postural	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Reacción tónica cuello	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Carretilla	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Patelar	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Tibial craneal	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Gastrocnemio	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Cutáneo del tronco	I (2) L1 D (2)	I (2) L3 D (2)	I (2) L5 D (2)	I (2) L5 D (2)
	Extensor cruzado	I (2) D (2)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3				

SUJETO N°2		Pretrasplante	Primer mes post	Segundo mes post	Tercer mes post
PROPIOCEPCION	Colocación visual y táctil	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
	Nudillos	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Profunda	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
DERMATOMEROS	Safeno	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Peróneo	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Tibial	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
MIXTAS	Salto sobre una ext	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
	Extensor postural	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
	Reacción tónica cuello	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
	Carretilla	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Patelar	I (3) D (3)	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Tibial craneal	I (3) D (3)	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Gastrocnemio	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (1) D (0)	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Cutáneo del tronco	I (2) T11 D (2)	I (2) L2 D (2)	I (2) L5 D (2)	I (2) L5 D (2)
	Extensor cruzado	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3				

SUJETO N°3		Pretrasplante	Primer mes post	Segundo mes post	Tercer mes post
PROPIOCEPCION	Colocación visual y táctil	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Nudillos	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Profunda	I (0) D (0)	I (0) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
DERMATOMEROS	Safeno	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Peróneo	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Tibial	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
MIXTAS	Salto sobre una ext	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Extensor postural	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Reacción tónica cuello	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Carretilla	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Patelar	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Tibial craneal	I (3) D (3)	I (0) D (0)	I (2) D (1)	I (2) D (2)
	Gastrocnemio	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (1) D (1)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Cutáneo del tronco	I (2) T10 D (2)	I (2) L1 D (2)	I (2) L5 D (2)	I (2) L5 D (2)
	Extensor cruzado	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3				

SUJETO N°4		Pretrasplante	Primer mes post	Segundo mes post	Tercer mes post
PROPIOCEPCION	Colocación visual y táctil	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Nudillos	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Profunda	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
DERMATOMEROS	Safeno	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Peróneo	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Tibial	I (0) D (0)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
MIXTAS	Salto sobre una ext	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Extensor postural	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Reacción tónica cuello	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Carretilla	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Patelar	I (3) D (3)	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Tibial craneal	I (3) D (3)	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Gastrocnemio	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
	Cutáneo del tronco	I (2) L5 D (2)	I (2) L5 D (2)	I (2) L5 D (2)	I (2) L5 D (2)
	Extensor cruzado	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3				

SUJETO N°7		Pretrasplante	Primer mes post	Segundo mes post	Tercer mes post
PROPIOCEPCION	Colocación visual y táctil	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Nudillos	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Profunda	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
DERMATOMEROS	Safeno	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Peróneo	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
	Tibial	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (2) D (2)
MIXTAS	Salto sobre una ext	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (1) D (1)
	Extensor postural	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (1) D (1)
	Reacción tónica cuello	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (1) D (1)
	Carretilla	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Patelar	I (4) D (4)	I (3) D (3)	I (3) D (3)	I (2) D (2)
	Tibial craneal	I (3) D (3)	I (3) D (3)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Gastrocnemio	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)	I (1) D (1)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)	I (2) D (2)
	Cutáneo del tronco	I (2) T6 D (2)	I (2) T9 D (2)	I (2) T-10 D (2)	I (2) T-12 D (2)
	Extensor cruzado	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)	I (0) D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3				

SUJETO N°8		<u>Pretrasplante</u>		Primer mes post		Segundo mes post		Tercer mes post	
PROPIOCEPCION	Colocación visual y <u>tactil</u>	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
	Nudillos	I (0)	D (2)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)
	Profunda	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
DERMATOMEROS	Safeno	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)
	<u>Peróneo</u>	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)
	Tibial	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)
MIXTAS	Salto sobre una <u>ext</u>	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
	Extensor postural	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
	Reacción tónica cuello	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
	Carretilla	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
	Patelar	I (3)	D (3)	I (3)	D (3)	I (2)	D (2)	I (2)	D (1)
	Tibial craneal	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
	Gastrocnemio	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (1)	D (0)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
	Cutáneo del tronco	I (2)	T7 D (2)	I (2)	T9 D (2)	I (2)	T-10 D (2)	I (2)	T-13 D (2)
	Extensor cruzado	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3								

SUJETO N°9		Pretrasplante		Primer mes post		Segundo mes post		Tercer mes post	
PROPIOCEPCION	Colocación visual y <u>táctil</u>	I (0)	D (0)	I (0)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
	Nudillos	I (0)	D (0)	I (0)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
SENSIBILIDAD	Superficial	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
	Profunda	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
DERMATOMEROS	Safeno	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
	<u>Peróneo</u>	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
	Tibial	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (2)	I (2)	D (2)
MIXTAS	Salto sobre una <u>ext</u>	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
	Estancia y marcha en bípedo lateral	I (0)	D (0)	I (0)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)
	Extensor postural	I (0)	D (0)	I (0)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)
	Reacción tónica cuello	I (0)	D (0)	I (0)	D (1)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)
	Carretilla	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (1)	D (1)	I (1)	D (1)
REFLEJOS ESPINALES	Flexor	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
	Patelar	I (4)	D (4)	I (3)	D (3)	I (3)	D (3)	I (2)	D (2)
	Tibial craneal	I (3)	D (3)	I (3)	D (3)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
	Gastrocnemio	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
OTROS REFLEJOS	Perineal	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)	I (2)	D (2)
	Cutáneo del tronco	I (2)	T6 D (2)	I (2)	T9 D (2)	I (2)	T-10 D (2)	I (2)	T-12 D (2)
	Extensor cruzado	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)	I (0)	D (0)
LOCALIZACION DE LA LESION	T3-L3								

Bibliografía

- Adams KL, Gallo V. 2018. The diversity and disparity of the glial scar. *Nature neuroscience* 21:9-15.
- Agrawal SK, Fehlings MG. 1996. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:545-552.
- Akbik F, Cafferty WB, Strittmatter SM. 2012. Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Experimental neurology* 235:43-52.
- Akiyama Y, Lankford K, Radtke C, Greer CA, Kocsis JD. 2004. Remyelination of spinal cord axons by olfactory ensheathing cells and Schwann cells derived from a transgenic rat expressing alkaline phosphatase marker gene. *Neuron glia biology* 1:47-55.
- Alilain WJ, Horn KP, Hu H, Dick TE, Silver J. 2011. Functional regeneration of respiratory pathways after spinal cord injury. *Nature* 475:196-200.
- Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. 2015. Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects. *Frontiers in molecular neuroscience* 8:35.
- Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. 2019. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Frontiers in neurology* 10:282.
- Allison DJ, Ditor DS. 2015. Immune dysfunction and chronic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord* 53:14-18.
- Almad A, Sahinkaya FR, McTigue DM. 2011. Oligodendrocyte fate after spinal cord injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8:262-273.

- Amemiya S, Kamiya T, Nito C, Inaba T, Kato K, Ueda M, Shimazaki K, Katayama Y. 2005. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats. *European journal of pharmacology* 516:125-130.
- Anderson KD. 2004. Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population. *Journal of neurotrauma* 21:1371-1383.
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV. 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532:195-200.
- Andrews MR, Stelzner DJ. 2004. Modification of the regenerative response of dorsal column axons by olfactory ensheathing cells or peripheral axotomy in adult rat. *Exp Neurol* 190:311-327.
- Andrews MR, Stelzner DJ. 2007. Evaluation of olfactory ensheathing and schwann cells after implantation into a dorsal injury of adult rat spinal cord. *Journal of neurotrauma* 24:1773-1792.
- Angeli CA, Boakye M, Morton RA, Vogt J, Benton K, Chen Y, Ferreira CK, Harkema SJ. 2018. Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury. *The New England journal of medicine* 379:1244-1250.
- Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH. 2016. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Frontiers in cellular neuroscience* 10:98.
- Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. 1998. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation research* 83:233-240.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW. 2000. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2427-2438.
- Au E, Roskams AJ. 2003. Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41:224-236.
- Au WW, Treloar HB, Greer CA. 2002. Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *The Journal of comparative neurology* 446:68-80.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014:360438.

- Bains M, Hall ED. 2012. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochimica et biophysica acta* 1822:675-684.
- Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieder FW, Meletis K, Frisén J. 2010. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell stem cell* 7:470-482.
- Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, Ruhrberg C, Liu KJ, Baker CV. 2010. Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:21040-21045.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma* 12:1-21.
- Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. 2000. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 17:915-925.
- Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. 2002. Cell death in models of spinal cord injury. *Progress in brain research* 137:37-47.
- Bergknot N, Egenvall A, Hagman R, Gustas P, Hazewinkel HA, Meij BP, Lagerstedt AS. 2012. Incidence of intervertebral disk degeneration-related diseases and associated mortality rates in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 240:1300-1309.
- Blumer CE, Quine S. 1995. Prevalence of spinal cord injury: an international comparison. *Neuroepidemiology* 14:258-268.
- Boruch AV, Connors JJ, Pipitone M, Deadwyler G, Storer PD, Devries GH, Jones KJ. 2001. Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line. *Glia* 33:225-229.
- Botero. L. 2015. Evaluación de la regeneración axonal en ratas con sección medular aguda y crónica después del trasplante con CGEO y aFGF. In: TESIS. DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS.: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. p 249.
- Boyd JG, Doucette R, Kawaja MD. 2005. Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:694-703.
- Boyles JK, Zoellner CD, Anderson LJ, Kosik LM, Pitas RE, Weisgraber KH, Hui DY, Mahley RW, Gebicke-Haerter PJ, Ignatius MJ, et al. 1989. A role for

- apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *The Journal of clinical investigation* 83:1015-1031.
- Brennan FH, Gordon R, Lao HW, Biggins PJ, Taylor SM, Franklin RJ, Woodruff TM, Ruitenber MJ. 2015. The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astrogliosis following Spinal Cord Injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:6517-6531.
- Brigstock DR. 2002. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis* 5:153-165.
- Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. 2003. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7789-7800.
- Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, Brook GA. 2009. NG2 and phosphacan are present in the astroglial scar after human traumatic spinal cord injury. *BMC neurology* 9:32.
- Cao L, Su Z, Zhou Q, Lv B, Liu X, Jiao L, Li Z, Zhu Y, Huang Z, Huang A, He C. 2006. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia* 54:536-544.
- Cao Z, Gao Y, Deng K, Williams G, Doherty P, Walsh FS. 2010. Receptors for myelin inhibitors: Structures and therapeutic opportunities. *Molecular and cellular neurosciences* 43:1-14.
- Carlson GD, Gorden C. 2002. Current developments in spinal cord injury research. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 2:116-128.
- Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ. 2004. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:5670-5683.
- Chehrehasa F, Ekberg JA, Lineburg K, Amaya D, Mackay-Sim A, St John JA. 2012. Two phases of replacement replenish the olfactory ensheathing cell population after injury in postnatal mice. *Glia* 60:322-332.
- Chehrehasa F, Windus LC, Ekberg JA, Scott SE, Amaya D, Mackay-Sim A, St John JA. 2010. Olfactory glia enhance neonatal axon regeneration. *Molecular and cellular neurosciences* 45:277-288.

- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation* 11:98.
- Chung RS, Woodhouse A, Fung S, Dickson TC, West AK, Vickers JC, Chuah MI. 2004. Olfactory ensheathing cells promote neurite sprouting of injured axons in vitro by direct cellular contact and secretion of soluble factors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:1238-1245.
- Cifuentes J.M. P. Fernández de Trocóniz NA, R. Bermúdez, P. Sánchez, I. Salazar. 2011. *Anatomía Veterinaria*.
- Clausen F, Marklund N, Lewén A, Enblad P, Basu S, Hillered L. 2012. Interstitial F(2)-isoprostane 8-iso-PGF(2 α) as a biomarker of oxidative stress after severe human traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma* 29:766-775.
- Collazos-Castro JE, Muneton-Gomez VC, Nieto-Sampedro M. 2005. Olfactory glia transplantation into cervical spinal cord contusion injuries. *Journal of neurosurgery Spine* 3:308-317.
- Craven BA, Neuberger T, Paterson EG, Webb AG, Josephson EM, Morrison EE, Settles GS. 2007. Reconstruction and morphometric analysis of the nasal airway of the dog (*Canis familiaris*) and implications regarding olfactory airflow. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)* 290:1325-1340.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. 2014. Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology* 253:197-207.
- Curt A, Van Hedel HJ, Klaus D, Dietz V. 2008. Recovery from a spinal cord injury: significance of compensation, neural plasticity, and repair. *Journal of neurotrauma* 25:677-685.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews* 53:135-159.
- Czepiel M, Boddeke E, Copray S. 2015. Human oligodendrocytes in remyelination research. *Glia* 63:513-530.
- D'Autréaux B, Toledano MB. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:813-824.
- David S, Lopez-Vales R, Wee Yong V. 2012a. Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury: potential therapeutic implications. *Handbook of clinical neurology* 109:485-502.

- David S, Zarruk JG, Ghasemlou N. 2012b. Inflammatory pathways in spinal cord injury. *International review of neurobiology* 106:127-152.
- de Castro F. 2009. Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. *Frontiers in neuroscience* 3:52.
- Decimo I, Bifari F, Rodriguez FJ, Malpeli G, Dolci S, Lavarini V, Pretto S, Vasquez S, Sciancalepore M, Montalbano A, Berton V, Krampera M, Fumagalli G. 2011. Nestin- and doublecortin-positive cells reside in adult spinal cord meninges and participate in injury-induced parenchymal reaction. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29:2062-2076.
- Deng C, Gorrie C, Hayward I, Elston B, Venn M, Mackay-Sim A, Waite P. 2006. Survival and migration of human and rat olfactory ensheathing cells in intact and injured spinal cord. *Journal of neuroscience research* 83:1201-1212.
- DeVivo M, Biering-Sorensen F, Charlifue S, Noonan V, Post M, Stripling T, Wing P. 2006. International Spinal Cord Injury Core Data Set. *Spinal cord* 44:535-540.
- DeVivo MJ, Chen Y. 2011. Trends in new injuries, prevalent cases, and aging with spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 92:332-338.
- Devon R, Doucette R. 1992. Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain research* 589:175-179.
- Devon R, Doucette R. 1995. Olfactory ensheathing cells do not require L-ascorbic acid in vitro to assemble a basal lamina or to myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain research* 688:223-229.
- Ditunno JF, Jr., Young W, Donovan WH, Creasey G. 1994. The international standards booklet for neurological and functional classification of spinal cord injury. American Spinal Injury Association. *Paraplegia* 32:70-80.
- Donnelly DJ, Popovich PG. 2008. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental neurology* 209:378-388.
- Doucette JR. 1984. The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *The Anatomical record* 210:385-391.
- Doucette R. 1990. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3:433-449.
- Doucette R. 1996. Immunohistochemical localization of laminin, fibronectin and collagen type IV in the nerve fiber layer of the olfactory bulb. *International journal of*

- developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 14:945-959.
- Duchen MR. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular aspects of medicine* 25:365-451.
- Dunai Z, Bauer PI, Mihalik R. 2011. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathology oncology research : POR* 17:791-800.
- Durham-Lee JC, Wu Y, Mokkapati VU, Paulucci-Holthauzen AA, Nesic O. 2012. Induction of angiopoietin-2 after spinal cord injury. *Neuroscience* 202:454-464.
- Dyck S, Kataria H, Akbari-Kelachayeh K, Silver J, Karimi-Abdolrezaee S. 2019. LAR and PTP σ receptors are negative regulators of oligodendrogenesis and oligodendrocyte integrity in spinal cord injury. *Glia* 67:125-145.
- Dyck S, Kataria H, Alizadeh A, Santhosh KT, Lang B, Silver J, Karimi-Abdolrezaee S. 2018. Perturbing chondroitin sulfate proteoglycan signaling through LAR and PTP σ receptors promotes a beneficial inflammatory response following spinal cord injury. *Journal of neuroinflammation* 15:90.
- Dyck SM, Alizadeh A, Santhosh KT, Proulx EH, Wu CL, Karimi-Abdolrezaee S. 2015. Chondroitin Sulfate Proteoglycans Negatively Modulate Spinal Cord Neural Precursor Cells by Signaling Through LAR and RPTP σ and Modulation of the Rho/ROCK Pathway. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33:2550-2563.
- Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. 2015. Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and pathologic central nervous system. *Experimental neurology* 269:169-187.
- Eckhardt ER, Cai L, Sun B, Webb NR, van der Westhuyzen DR. 2004. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *The Journal of biological chemistry* 279:14372-14381.
- Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, D WC, Harrop JS, Aarabi B, Shaffrey C, Dvorak M, Fisher C, Arnold P, Massicotte EM, Lewis S, Rampersaud R. 2012. Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PloS one* 7:e32037.
- Feitosa MLT, Sarmiento CAP, Bocabello RZ, Beltrão-Braga PCB, Pignatari GC, Giglio RF, Miglino MA, Orlandin JR, Ambrósio CE. 2017. Transplantation of human immature dental pulp stem cell in dogs with chronic spinal cord injury. *Acta cirurgica brasileira* 32:540-549.

- Fernyhough P, Calcutt NA. 2010. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell calcium* 47:130-139.
- Feron F, Perry C, Cochrane J, Licina P, Nowitzke A, Urquhart S, Geraghty T, Mackay-Sim A. 2005. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 128:2951-2960.
- Figley SA, Khosravi R, Legasto JM, Tseng YF, Fehlings MG. 2014. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 31:541-552.
- Fluehmann G, Doherr MG, Jaggy A. 2006. Canine neurological diseases in a referral hospital population between 1989 and 2000 in Switzerland. *The Journal of small animal practice* 47:582-587.
- Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, Wray S. 2011. Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6915-6927.
- Forni PE, Wray S. 2012. Neural crest and olfactory system: new prospective. *Molecular neurobiology* 46:349-360.
- Franceschini IA, Barnett SC. 1996. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Developmental biology* 173:327-343.
- Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. 2000. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 98:41-53.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19:107-120.
- Garcia-Alias G, Lopez-Vales R, Fores J, Navarro X, Verdu E. 2004. Acute transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells promotes recovery after spinal cord injury in the rat. *Journal of neuroscience research* 75:632-641.

- Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. 2011. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science (New York, NY)* 333:238-242.
- Gottlieb M, Matute C. 1997. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17:290-300.
- Granger N, Blamires H, Franklin RJ, Jeffery ND. 2012. Autologous olfactory mucosal cell transplants in clinical spinal cord injury: a randomized double-blinded trial in a canine translational model. *Brain : a journal of neurology* 135:3227-3237.
- Graziadei PP, Graziadei GA. 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of neurocytology* 8:1-18.
- Gu M, Gao Z, Li X, Guo L, Lu T, Li Y, He X. 2017. Conditioned medium of olfactory ensheathing cells promotes the functional recovery and axonal regeneration after contusive spinal cord injury. *Brain research* 1654:43-54.
- Gudz TI, Komuro H, Macklin WB. 2006. Glutamate stimulates oligodendrocyte progenitor migration mediated via an alpha5 integrin/myelin proteolipid protein complex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2458-2466.
- Guerout N, Derambure C, Drouot L, Bon-Mardion N, Duclos C, Boyer O, Marie JP. 2010. Comparative gene expression profiling of olfactory ensheathing cells from olfactory bulb and olfactory mucosa. *Glia* 58:1570-1580.
- Guest J, Herrera LP, Qian T. 2006. Rapid recovery of segmental neurological function in a tetraplegic patient following transplantation of fetal olfactory bulb-derived cells. *Spinal cord* 44:135-142.
- Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov TL, Azzolin N, Kazemi S, Streppel M, Neiss WF, Angelov DN. 2002. Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:7121-7131.
- Guo JS, Zeng YS, Li HB, Huang WL, Liu RY, Li XB, Ding Y, Wu LZ, Cai DZ. 2007. Cotransplant of neural stem cells and NT-3 gene modified Schwann cells promote the recovery of transected spinal cord injury. *Spinal cord* 45:15-24.

- Hall ED. 2011. Antioxidant therapies for acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8:152-167.
- Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. 1992. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *Journal of lipid research* 33:1677-1688.
- Harkey HL, 3rd, White EA, Tibbs RE, Jr., Haines DE. 2003. A clinician's view of spinal cord injury. *Anatomical record Part B, New anatomist* 271:41-48.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. 2008. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:7231-7243.
- Higginson JR, Barnett SC. 2011. The culture of olfactory ensheathing cells (OECs)--a distinct glial cell type. *Experimental neurology* 229:2-9.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry* 72:609-642.
- Huang L, Wu ZB, Zhuge Q, Zheng W, Shao B, Wang B, Sun F, Jin K. 2014. Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *International journal of medical sciences* 11:344-348.
- Huang ZH, Wang Y, Cao L, Su ZD, Zhu YL, Chen YZ, Yuan XB, He C. 2008. Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell research* 18:479-490.
- Huber JD, Hau VS, Mark KS, Brown RC, Campos CR, Davis TP. 2002. Viability of microvascular endothelial cells to direct exposure of formalin, lambda-carrageenan, and complete Freund's adjuvant. *European journal of pharmacology* 450:297-304.
- Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE. 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature neuroscience* 16:668-676.
- Imaizumi T, Lankford KL, Burton WV, Fodor WL, Kocsis JD. 2000a. Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nature biotechnology* 18:949-953.

- Imaizumi T, Lankford KL, Kocsis JD. 2000b. Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain research* 854:70-78.
- Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD. 1998. Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:6176-6185.
- Ito D, Ibanez C, Ogawa H, Franklin RJ, Jeffery ND. 2006. Comparison of cell populations derived from canine olfactory bulb and olfactory mucosal cultures. *American journal of veterinary research* 67:1050-1056.
- Jain NB, Ayers GD, Peterson EN, Harris MB, Morse L, O'Connor KC, Garshick E. 2015. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993-2012. *Jama* 313:2236-2243.
- Jani HR, Raisman G. 2004. Ensheathing cell cultures from the olfactory bulb and mucosa. *Glia* 47:130-137.
- Jeffery ND, Lakatos A, Franklin RJ. 2005. Autologous olfactory glial cell transplantation is reliable and safe in naturally occurring canine spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 22:1282-1293.
- Jiang S, Ballerini P, Buccella S, Giuliani P, Jiang C, Huang X, Rathbone MP. 2008. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. *Purinergic signalling* 4:61-71.
- Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH. 2001. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *The Journal of physiology* 533:83-89.
- Jung DI, Ha J, Kang BT, Kim JW, Quan FS, Lee JH, Woo EJ, Park HM. 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the neurological sciences* 285:67-77.
- Kafitz KW, Greer CA. 1999. Olfactory ensheathing cells promote neurite extension from embryonic olfactory receptor cells in vitro. *Glia* 25:99-110.
- Karadottir R, Attwell D. 2007. Neurotransmitter receptors in the life and death of oligodendrocytes. *Neuroscience* 145:1426-1438.

- Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. 2011. The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Molecular brain* 4:34.
- Kattail D, Furlan JC, Fehlings MG. 2009. Epidemiology and clinical outcomes of acute spine trauma and spinal cord injury: experience from a specialized spine trauma center in Canada in comparison with a large national registry. *The Journal of trauma* 67:936-943.
- Khankan RR, Griffis KG, Haggerty-Skeans JR, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR, Phelps PE. 2016. Olfactory Ensheathing Cell Transplantation after a Complete Spinal Cord Transection Mediates Neuroprotective and Immunomodulatory Mechanisms to Facilitate Regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:6269-6286.
- Kim YH, Ha KY, Kim SI. 2017. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clinics in orthopedic surgery* 9:1-9.
- Kirshblum S, Botticello A, Benedetto J, Donovan J, Marino R, Hsieh S, Wagaman N. 2020. A Comparison of Diagnostic Stability of the ASIA Impairment Scale Versus Frankel Classification Systems for Traumatic Spinal Cord Injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*.
- Kocsis JD, Lankford KL, Sasaki M, Radtke C. 2009. Unique in vivo properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury. *Neuroscience letters* 456:137-142.
- Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Schwab JM, Pruss H. 2010. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia* 58:1748-1756.
- Kumar R, Hayat S, Felts P, Bunting S, Wigley C. 2005. Functional differences and interactions between phenotypic subpopulations of olfactory ensheathing cells in promoting CNS axonal regeneration. *Glia* 50:12-20.
- Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. 2004. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 4:451-464.
- Lang BT, Cregg JM, DePaul MA, Tran AP, Xu K, Dyck SM, Madalena KM, Brown BP, Weng YL, Li S, Karimi-Abdolrezaee S, Busch SA, Shen Y, Silver J. 2015. Modulation of the proteoglycan receptor PTP σ promotes recovery after spinal cord injury. *Nature* 518:404-408.

- Lankford KL, Brown RJ, Sasaki M, Kocsis JD. 2014. Olfactory ensheathing cells, but not Schwann cells, proliferate and migrate extensively within moderately X-irradiated juvenile rat brain. *Glia* 62:52-63.
- Lau LW, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Cua R, Döring A, Sloka S, Stirling DP, Rivest S, Yong VW. 2012. Chondroitin sulfate proteoglycans in demyelinated lesions impair remyelination. *Annals of neurology* 72:419-432.
- Lee JK, Zheng B. 2012. Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury. *Experimental neurology* 235:33-42.
- Leung CT, Coulombe PA, Reed RR. 2007. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nature neuroscience* 10:720-726.
- Li FQ, Fowler KA, Neil JE, Colton CA, Vitek MP. 2010. An apolipoprotein E-mimetic stimulates axonal regeneration and remyelination after peripheral nerve injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 334:106-115.
- Li S, Stys PK. 2000. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:1190-1198.
- Li S, Stys PK. 2001. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107:675-683.
- Li Y, Decherchi P, Raisman G. 2003. Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:727-731.
- Li Y, Field PM, Raisman G. 1997. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science (New York, NY)* 277:2000-2002.
- Li Y, Li D, Raisman G. 2005. Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *Journal of neurocytology* 34:343-351.
- Lim JH, Byeon YE, Ryu HH, Jeong YH, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. 2007. Transplantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *Journal of veterinary science* 8:275-282.
- Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. 2010. Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury? *Glia* 58:125-134.

- Lingor P, Koch JC, Tonges L, Bahr M. 2012. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell and tissue research* 349:289-311.
- Lipson AC, Widenfalk J, Lindqvist E, Ebendal T, Olson L. 2003. Neurotrophic properties of olfactory ensheathing glia. *Experimental neurology* 180:167-171.
- Liu M, Wu W, Li H, Li S, Huang LT, Yang YQ, Sun Q, Wang CX, Yu Z, Hang CH. 2015. Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice. *The journal of spinal cord medicine* 38:745-753.
- Liu S, Li Y, Choi HMC, Sarkar C, Koh EY, Wu J, Lipinski MM. 2018. Lysosomal damage after spinal cord injury causes accumulation of RIPK1 and RIPK3 proteins and potentiation of necroptosis. *Cell death & disease* 9:476.
- Liu Y, Levine B. 2015. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell death and differentiation* 22:367-376.
- LoPachin RM, Gaughan CL, Lehning EJ, Kaneko Y, Kelly TM, Blight A. 1999. Experimental spinal cord injury: spatiotemporal characterization of elemental concentrations and water contents in axons and neuroglia. *Journal of neurophysiology* 82:2143-2153.
- López-Vales R, García-Alías G, Forés J, Navarro X, Verdú E. 2004. Increased expression of cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor in lesioned spinal cord by transplanted olfactory ensheathing cells. *Journal of neurotrauma* 21:1031-1043.
- Lu J, Feron F, Ho SM, Mackay-Sim A, Waite PM. 2001. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rats. *Brain research* 889:344-357.
- Lu M, Dong J, Lu T, Lv H, Yang P, Cheng Z, Li J, Liang B, Xu J, Li H, He X. 2014. Effects of different sera conditions on olfactory ensheathing cells in vitro. *International journal of molecular sciences* 16:420-438.
- Lu P, Yang H, Culbertson M, Graham L, Roskams AJ, Tuszynski MH. 2006. Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:11120-11130.
- Mackay-Sim A, Feron F, Cochrane J, Bassingthwaighe L, Bayliss C, Davies W, Fronck P, Gray C, Kerr G, Licina P, Nowitzke A, Perry C, Silburn PA, Urquhart S,

- Geraghty T. 2008. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain : a journal of neurology* 131:2376-2386.
- Masgutova GA, Savchenko EA, Viktorov IV, Masgutov RF, Chelyshev YA. 2010. Reaction of oligoglia to spinal cord injury in rats and transplantation of human olfactory ensheathing cells. *Bulletin of experimental biology and medicine* 149:135-139.
- Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, Zhu L, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Gumucio DL, Núñez G, Inohara N. 2003. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 303:69-73.
- Matute C, Torre I, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Alberdi E, Etxebarria E, Arranz AM, Ravid R, Rodríguez-Antigüedad A, Sánchez-Gómez M, Domercq M. 2007. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9525-9533.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieder FW. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science (New York, NY)* 294:1354-1357.
- Maynard FM, Jr., Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF, Jr., Donovan WH, Ducker TB, Garber SL, Marino RJ, Stover SL, Tator CH, Waters RL, Wilberger JE, Young W. 1997. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal cord* 35:266-274.
- Mazzone GL, Veeraraghavan P, Gonzalez-Inchauspe C, Nistri A, Uchitel OD. 2017. ASIC channel inhibition enhances excitotoxic neuronal death in an in vitro model of spinal cord injury. *Neuroscience* 343:398-410.
- McAdoo DJ, Hughes MG, Nie L, Shah B, Clifton C, Fullwood S, Hulsebosch CE. 2005. The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage --> glutamate release --> damage --> glutamate release --> etc. *Brain research* 1038:92-99.
- McKinley WO, Seel RT, Gadi RK, Tewksbury MA. 2001. Nontraumatic vs. traumatic spinal cord injury: a rehabilitation outcome comparison. *American journal of physical medicine & rehabilitation* 80:693-699; quiz 700, 716.

- McMahill BG, Borjesson DL, Sieber-Blum M, Nolta JA, Sturges BK. 2015. Stem cells in canine spinal cord injury--promise for regenerative therapy in a large animal model of human disease. *Stem cell reviews and reports* 11:180-193.
- McTigue DM, Tripathi RB. 2008. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry* 107:1-19.
- Mizushima N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development* 21:2861-2873.
- Moore SA, Early PJ, Hettlich BF. 2016. Practice patterns in the management of acute intervertebral disc herniation in dogs. *The Journal of small animal practice* 57:409-415.
- Moreno-Flores MT, Avila J. 2006. The quest to repair the damaged spinal cord. *Recent patents on CNS drug discovery* 1:55-63.
- Moreno-Flores MT, Lim F, Martín-Bermejo MJ, Díaz-Nido J, Avila J, Wandosell F. 2003. Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *Journal of neurochemistry* 85:861-871.
- Nagoshi N, Okano H. 2018. iPSC-derived neural precursor cells: potential for cell transplantation therapy in spinal cord injury. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75:989-1000.
- Nakae A, Nakai K, Yano K, Hosokawa K, Shibata M, Mashimo T. 2011. The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:939023.
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ. 2001. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia* 34:81-87.
- Nocentini S, Reginensi D, Garcia S, Carulla P, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Trepát X, Bribian A, del Río JA. 2012. Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69:1689-1703.
- Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. 2004. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of neurotrauma* 21:429-440.
- Novikova LN, Lobov S, Wiberg M, Novikov LN. 2011. Efficacy of olfactory ensheathing cells to support regeneration after spinal cord injury is influenced by method of culture preparation. *Experimental neurology* 229:132-142.
- O'Toole DA, West AK, Chuah MI. 2007. Effect of olfactory ensheathing cells on reactive astrocytes in vitro. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64:1303-1309.

- Olby N, Harris T, Burr J, Munana K, Sharp N, Keene B. 2004. Recovery of pelvic limb function in dogs following acute intervertebral disc herniations. *Journal of neurotrauma* 21:49-59.
- Olby NJ, De Risio L, Munana KR, Wosar MA, Skeen TM, Sharp NJ, Keene BW. 2001. Development of a functional scoring system in dogs with acute spinal cord injuries. *American journal of veterinary research* 62:1624-1628.
- Olby NJ, Lim JH, Babb K, Bach K, Domaracki C, Williams K, Griffith E, Harris T, Muguet-Chanoit A. 2014. Gait scoring in dogs with thoracolumbar spinal cord injuries when walking on a treadmill. *BMC veterinary research* 10:58.
- Oudega M, Xu XM. 2006. Schwann cell transplantation for repair of the adult spinal cord. *Journal of neurotrauma* 23:453-467.
- Oyinbo CA. 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis* 71:281-299.
- Pandya JD, Nukala VN, Sullivan PG. 2013. Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters. *Frontiers in neuroenergetics* 5:10.
- Park SS, Lee YJ, Lee SH, Lee D, Choi K, Kim WH, Kweon OK, Han HJ. 2012. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. *Cytotherapy* 14:584-597.
- Pastrana E, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F, Minichiello L, Diaz-Nido J. 2007. BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochemistry international* 50:491-498.
- Pastrana E, Moreno-Flores MT, Gurzov EN, Avila J, Wandosell F, Diaz-Nido J. 2006. Genes associated with adult axon regeneration promoted by olfactory ensheathing cells: a new role for matrix metalloproteinase 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:5347-5359.
- Penha EM, Meira CS, Guimarães ET, Mendonça MV, Gravelly FA, Pinheiro CM, Pinheiro TM, Barrouin-Melo SM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. 2014. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. *Stem cells international* 2014:437521.
- Peterson SL, Anderson AJ. 2014. Complement and spinal cord injury: traditional and non-traditional aspects of complement cascade function in the injured spinal cord microenvironment. *Experimental neurology* 258:35-47.

- Petrosyan HA, Hunanyan AS, Alessi V, Schnell L, Levine J, Arvanian VL. 2013. Neutralization of inhibitory molecule NG2 improves synaptic transmission, retrograde transport, and locomotor function after spinal cord injury in adult rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:4032-4043.
- Pivovarova NB, Andrews SB. 2010. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *The FEBS journal* 277:3622-3636.
- Pixley SK. 1992. The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia* 5:269-284.
- Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. 2004. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 15:415-436.
- Rabchevsky AG, Kitzman PH. 2011. Latest approaches for the treatment of spasticity and autonomic dysreflexia in chronic spinal cord injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8:274-282.
- Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, Gallo V, Kocsis JD. 2011. CNPase expression in olfactory ensheathing cells. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:608496.
- Ramer LM, Au E, Richter MW, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. 2004. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *The Journal of comparative neurology* 473:1-15.
- Ramon-Cueto A, Avila J. 1998. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain research bulletin* 46:175-187.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J. 2000. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25:425-435.
- Ramon-Cueto A, Munoz-Quiles C. 2011. Clinical application of adult olfactory bulb ensheathing glia for nervous system repair. *Experimental neurology* 229:181-194.
- Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. 1994. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Experimental neurology* 127:232-244.
- Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131:770-783.

- Regan RF, Choi DW. 1991. Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Neuroscience* 43:585-591.
- Reginensi D, Carulla P, Nocentini S, Seira O, Serra-Picamal X, Torres-Espín A, Matamoros-Angles A, Gavín R, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Samitier J, Trepát X, Navarro X, del Río JA. 2015. Increased migration of olfactory ensheathing cells secreting the Nogo receptor ectodomain over inhibitory substrates and lesioned spinal cord. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72:2719-2737.
- Reithmeier RA. 1994. Mammalian exchangers and co-transporters. *Current opinion in cell biology* 6:583-594.
- Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ. 2005. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:10700-10711.
- Roet KC, Bossers K, Franssen EH, Ruitenbergh MJ, Verhaagen J. 2011. A meta-analysis of microarray-based gene expression studies of olfactory bulb-derived olfactory ensheathing cells. *Experimental neurology* 229:10-45.
- Roet KC, Franssen EH, de Bree FM, Essing AH, Zijlstra SJ, Fagoe ND, Eggink HM, Eggers R, Smit AB, van Kesteren RE, Verhaagen J. 2013. A multilevel screening strategy defines a molecular fingerprint of proregenerative olfactory ensheathing cells and identifies SCARB2, a protein that improves regenerative sprouting of injured sensory spinal axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:11116-11135.
- Roet KC, Verhaagen J. 2014. Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cells. *Experimental neurology* 261:594-609.
- Rotenberg BW, Saunders S, Duggal N. 2011. Olfactory outcomes after endoscopic transsphenoidal pituitary surgery. *The Laryngoscope* 121:1611-1613.
- Roudnicky F, Poyet C, Wild P, Krampitz S, Negrini F, Huggenberger R, Rogler A, Stöhr R, Hartmann A, Provenzano M, Otto VI, Detmar M. 2013. Endocan is upregulated on tumor vessels in invasive bladder cancer where it mediates VEGF-A-induced angiogenesis. *Cancer research* 73:1097-1106.

- Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical focus* 25:E2.
- Ryu HH, Lim JH, Byeon YE, Park JR, Seo MS, Lee YW, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. 2009. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of veterinary science* 10:273-284.
- Sandvig I, Thuen M, Hoang L, Olsen Ø, Sardella TC, Brekken C, Tvedt KE, Barnett SC, Haraldseth O, Berry M, Sandvig A. 2012. In vivo MRI of olfactory ensheathing cell grafts and regenerating axons in transplant mediated repair of the adult rat optic nerve. *NMR in biomedicine* 25:620-631.
- Santamaría AJ, Solano JP, Benavides FD, Guest JD. 2018. Intraspinal Delivery of Schwann Cells for Spinal Cord Injury. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1739:467-484.
- Sarmiento CA, Rodrigues MN, Bocabello RZ, Mess AM, Miglino MA. 2014. Pilot study: bone marrow stem cells as a treatment for dogs with chronic spinal cord injury. *Regenerative medicine research* 2:9.
- Sasaki M, Hains BC, Lankford KL, Waxman SG, Kocsis JD. 2006. Protection of corticospinal tract neurons after dorsal spinal cord transection and engraftment of olfactory ensheathing cells. *Glia* 53:352-359.
- Sasaki M, Lankford KL, Zemedkun M, Kocsis JD. 2004. Identified olfactory ensheathing cells transplanted into the transected dorsal funiculus bridge the lesion and form myelin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:8485-8493.
- Sekhon LH, Fehlings MG. 2001. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 26:S2-12.
- Shao C, Roberts KN, Markesbery WR, Scheff SW, Lovell MA. 2006. Oxidative stress in head trauma in aging. *Free radical biology & medicine* 41:77-85.
- Shende P, Subedi M. 2017. Pathophysiology, mechanisms and applications of mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 91:693-706.
- Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. 2014. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in neurobiology* 114:25-57.

- Simón D, Martín-Bermejo MJ, Gallego-Hernández MT, Pastrana E, García-Escudero V, García-Gómez A, Lim F, Díaz-Nido J, Avila J, Moreno-Flores MT. 2011. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 by olfactory ensheathing glia promotes axonal regeneration. *Glia* 59:1458-1471.
- Smale KA, Doucette R, Kawaja MD. 1996. Implantation of olfactory ensheathing cells in the adult rat brain following fimbria-fornix transection. *Experimental neurology* 137:225-233.
- Smith PM, Jeffery ND. 2006. Histological and ultrastructural analysis of white matter damage after naturally-occurring spinal cord injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 16:99-109.
- Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, Bray E, Lyapichev K, Ramos J, Krishnan V, Lai-Hsu C, Park KK, Tsoulfas P, Lee JK. 2013. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:13882-13887.
- Steeves JD, Lammertse D, Curt A, Fawcett JW, Tuszynski MH, Ditunno JF, Ellaway PH, Fehlings MG, Guest JD, Kleitman N, Bartlett PF, Blight AR, Dietz V, Dobkin BH, Grossman R, Short D, Nakamura M, Coleman WP, Gaveria M, Privat A. 2007. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury (SCI) as developed by the ICCP panel: clinical trial outcome measures. *Spinal cord* 45:206-221.
- Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. 1992. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12:430-439.
- Su Z, He C. 2010. Olfactory ensheathing cells: biology in neural development and regeneration. *Progress in neurobiology* 92:517-532.
- Su Z, Yuan Y, Chen J, Cao L, Zhu Y, Gao L, Qiu Y, He C. 2009. Reactive astrocytes in glial scar attract olfactory ensheathing cells migration by secreted TNF-alpha in spinal cord lesion of rat. *PLoS one* 4:e8141.
- Sun D, Lye-Barthel M, Masland RH, Jakobs TC. 2010. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:14008-14019.
- Tabakow P, Jarmundowicz W, Czapiga B, Fortuna W, Miedzybrodzki R, Czyz M, Huber J, Szarek D, Okurowski S, Szewczyk P, Gorski A, Raisman G. 2013. Transplantation

- of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell transplantation* 22:1591-1612.
- Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. 2003. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Annals of neurology* 53:588-595.
- Takahashi K, Rochford CD, Neumann H. 2005. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of experimental medicine* 201:647-657.
- Tamura K, Harada Y, Kunimi M, Takemitsu H, Hara Y, Nakamura T, Tagawa M. 2015. Autologous bone marrow mononuclear cell transplant and surgical decompression in a dog with chronic spinal cord injury. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 13:100-105.
- Tator CH, Fehlings MG. 1991. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery* 75:15-26.
- Toft A, Scott DT, Barnett SC, Riddell JS. 2007. Electrophysiological evidence that olfactory cell transplants improve function after spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* 130:970-984.
- Toft A, Tomé M, Lindsay SL, Barnett SC, Riddell JS. 2012. Transplant-mediated repair properties of rat olfactory mucosal OM-I and OM-II sphere-forming cells. *Journal of neuroscience research* 90:619-631.
- Tom VJ, Sandrow-Feinberg HR, Miller K, Santi L, Connors T, Lemay MA, Houlié JD. 2009. Combining peripheral nerve grafts and chondroitinase promotes functional axonal regeneration in the chronically injured spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:14881-14890.
- Tran AP, Warren PM, Silver J. 2018. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. *Physiological reviews* 98:881-917.
- Vanzulli I, Butt AM. 2015. mGluR5 protect astrocytes from ischemic damage in postnatal CNS white matter. *Cell calcium* 58:423-430.
- von Leden RE, Yauger YJ, Khayrullina G, Byrnes KR. 2017. Central Nervous System Injury and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase: Oxidative Stress and Therapeutic Targets. *Journal of neurotrauma* 34:755-764.
- Vukovic J, Marmorstein LY, McLaughlin PJ, Sasaki T, Plant GW, Harvey AR, Ruitenberg MJ. 2009. Lack of fibulin-3 alters regenerative tissue responses in the primary

- olfactory pathway. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 28:406-415.
- Wang Y, Wang J, Yang H, Zhou J, Feng X, Wang H, Tao Y. 2015. Necrostatin-1 mitigates mitochondrial dysfunction post-spinal cord injury. *Neuroscience* 289:224-232.
- Wang Z, Zhang C, Hong Z, Chen H, Chen W, Chen G. 2013. C/EBP homologous protein (CHOP) mediates neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine* 5:107-111.
- Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew MV. 2013. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:12870-12886.
- Wiese S, Karus M, Faissner A. 2012. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in pharmacology* 3:120.
- Wilson JR, Hashimoto RE, Dettori JR, Fehlings MG. 2011. Spinal cord injury and quality of life: a systematic review of outcome measures. *Evidence-based spine-care journal* 2:37-44.
- Wilson JR, Tetreault LA, Kwon BK, Arnold PM, Mroz TE, Shaffrey C, Harrop JS, Chapman JR, Casha S, Skelly AC, Holmer HK, Brodt ED, Fehlings MG. 2017. Timing of Decompression in Patients With Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *Global spine journal* 7:95s-115s.
- Windus LC, Lineburg KE, Scott SE, Claxton C, Mackay-Sim A, Key B, St John JA. 2010. Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67:1735-1750.
- Witcher KG, Eiferman DS, Godbout JP. 2015. Priming the inflammatory pump of the CNS after traumatic brain injury. *Trends in neurosciences* 38:609-620.
- Woodhall E, West AK, Vickers JC, Chuah MI. 2003. Olfactory ensheathing cell phenotype following implantation in the lesioned spinal cord. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60:2241-2253.
- Wu GH, Shi HJ, Che MT, Huang MY, Wei QS, Feng B, Ma YH, Wang LJ, Jiang B, Wang YQ, Han I, Ling EA, Zeng X, Zeng YS. 2018. Recovery of paralyzed limb motor function in canine with complete spinal cord injury following implantation of MSC-derived neural network tissue. *Biomaterials* 181:15-34.

- Wyndaele M, Wyndaele JJ. 2006. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal cord* 44:523-529.
- Xiong Y, Hall ED. 2009. Pharmacological evidence for a role of peroxynitrite in the pathophysiology of spinal cord injury. *Experimental neurology* 216:105-114.
- Xu GY, Liu S, Hughes MG, McAdoo DJ. 2008. Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neuroscience* 153:1034-1047.
- Xu Y, Kitada M, Yamaguchi M, Dezawa M, Ide C. 2006. Increase in bFGF-responsive neural progenitor population following contusion injury of the adult rodent spinal cord. *Neuroscience letters* 397:174-179.
- Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. 2001. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Experimental neurology* 172:115-127.
- Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. 2013. Reactive oxygen species in the immune system. *International reviews of immunology* 32:249-270.
- Yao R, Murtaza M, Velasquez JT, Todorovic M, Rayfield A, Ekberg J, Barton M, St John J. 2018. Olfactory Ensheathing Cells for Spinal Cord Injury: Sniffing Out the Issues. *Cell transplantation* 27:879-889.
- Yu D, Li M, Ni B, Kong J, Zhang Z. 2013. Induction of neuronal mitophagy in acute spinal cord injury in rats. *Neurotoxicity research* 24:512-522.
- Yuan YM, He C. 2013. The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neuroscience bulletin* 29:421-435.
- Zhang HY, Wang ZG, Wu FZ, Kong XX, Yang J, Lin BB, Zhu SP, Lin L, Gan CS, Fu XB, Li XK, Xu HZ, Xiao J. 2013. Regulation of autophagy and ubiquitinated protein accumulation by bFGF promotes functional recovery and neural protection in a rat model of spinal cord injury. *Molecular neurobiology* 48:452-464.
- Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Wu YP, Chen WS. 2012. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian journal of medical research* 135:287-296.
- Zhou K, Sansur CA, Xu H, Jia X. 2017. The Temporal Pattern, Flux, and Function of Autophagy in Spinal Cord Injury. *International journal of molecular sciences* 18.