

CULTIVOS DE CÉLULAS DE NERVIIO CIÁTICO Y DE GANGLIO DE LA RAÍZ DORSAL DE RATÓN ADULTO

Cell Cultures of the Sciatic Nerve and Dorsal Root Ganglia from Adult Mouse

OCHOA C.^{1,2}, Est-M.Sc.; PERDOMO S.¹, Est-Ph. D.; MORENO CM.^{1,2}, Est-Ph. D.; VIVAS O.^{1,2}, Est-Ph. D.; LEAL L.^{1,2}, M.Sc.; SPINEL C.^{1,2}, Ph. D.

¹ Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 # 45-03, Bogotá, Colombia. cmspinelg@unal.edu.co

Presentado 12 de abril de 2009, aceptado 2 de julio de 2009, correcciones 18 de noviembre de 2009.

RESUMEN

Las células de Schwann (CS) son la glía de sistema nervio periférico. El diseño de prótesis nerviosas se ha centrado en la producción de CS autólogas cultivadas a partir de nervios ciáticos (NC) y de ganglios de la raíz dorsal (GRD). Muy poca literatura reporta cultivo de células perineurales (CP) y fibroblastos endoneurales (FE), y no son consideradas como elementos a incluir en una prótesis. En este trabajo, se describe la importancia de la microdissección del nervio ciático y de los GRD para obtener cultivos de CS, FE y CP con $98\% \pm 2$ de purificación. Las CS crecen sobre diferentes soportes, con y sin mitógenos. Se obtuvo un porcentaje de CS elevado cuando se elimina el epineuro y perineuro de los NC $90\% \pm 3$ y la cápsula de los GRD $94\% \pm 3$ antes de la disociación enzimática, comparado a $70\% \pm 4,2$ u $80\% \pm 3,5$ sin microdissección. Los FE se adhieren preferencialmente en las primeras 24 h y 20% de suero favorece su crecimiento. En el primer subcultivo son 99% CS o FE, siendo confluentes a los 6 y 8 días respectivamente. Las CP o de la cápsula de GRD no se disocian y no crecen en sub-cultivos, únicamente crecen a partir de explantes de perineuro; no forman monocapa sino una "lámina" de múltiples capas celulares. En conclusión, la microdissección del GRD y del NC y su disociación son indispensables para obtener en pocos días CS, FE y CP de animales adultos en cultivos altamente purificados.

Palabras clave: nervio ciático; ganglio raíz dorsal; células de Schwann; células perineurales; fibroblastos endoneurales.

ABSTRACT

The Schwann cells (SC) are the glia of the peripheral nerve system. The nervous prostheses are related to the production of autologous SC obtained from peripheral nervous and dorsal root ganglia (DRG). There is a small amount of papers in the literature that report cultures of perineural cells (PC) and endoneural fibroblast (EF) as

elements to take account into prostheses. In this work, microdissection process and its importance is described in the sciatic nerve (SN) and the DRG to achieve SC, EF and PC cultures with a purities of 98%. SC grow on different supports with and without mitogens. An elevated percentage of SC were obtained when the epineurium and the perineurium were removed in SN ($90\% \pm 3$) and GRD ($94\% \pm 3$) before the enzymatic dissociation compared to seventy percentage or eighty percentage. EF adhered in the first twenty four hours and 20% of serum improved their growth. In the first passage, there is 99% SC or EF, and they get confluent during the six and eight days, respectively. PC or the cells of the DRG do not have neither a good dissociation, nor a growth in subcultures; they only grow from the perineurium explants that forms a lamina of several cellular layers more than a monolayer. In conclusion, DRG and SN microdissection and dissociation are indispensable to acquire in few days SC, EF and PC cultures with a high purity from adult animals.

Key words: Sciatic nerve, dorsal root ganglia, Schwann cells, perineurial cells, endoneurial fibroblasts.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso periférico (SNP) está constituido por nervios periféricos (Fig. 1A) y GRD (Fig. 1B) que reúnen los cuerpos de las neuronas o pericariones sensitivos; y el sistema nervioso autónomo cuyos ganglios y nervios se encuentran en los órganos que inervan. Los pericariones o cuerpos de neuronas están rodeados por células satélites, que son agrupadas por una cápsula (Fig. 1B) cuyo origen es meníngeo y delimita a cada GRD. Las células satélites en cultivo primario presentan forma ahusada muy similar a las CS de nervio (Chi *et al.*, 1993) y en cultivo las llaman CS indistintamente si su origen es de NP o de GRD. Los NP están constituidos por fibras nerviosas que son las neuritas, recubiertas por las células de Schwann (CS) o glía del SNP. Durante el desarrollo del SNP las CS migran de la cresta neural (Mirsky y Jessen, 1999b), y los autores sugieren que las presentes en los GRD y en las raíces espinales se derivarían directamente del tubo neural.

La mielina es un esfingolípido producido por la CS, su distribución y cantidad hacen que las fibras nerviosas se clasifiquen en fibras nerviosas miélicas o amielínicas; en las fibras miélicas hay un replegamiento continuo de la membrana plasmática de la CS sobre una sola neurita seguido de un engrosamiento de la neurita debido a la producción de este esfingolípido, formando lo que se conoce como vaina de mielina. En las fibras nerviosas amielínicas, la CS no forma mielina, como replegamiento, aunque si produce este esfingolípido y recubre varias neuritas a manera de sincitio, envolviendo una vez cada una de las neuritas que agrupa (Mirsky y Jessen, 1999a; Perdomo y Spinel, 2004). Las CS son el soporte y guía del crecimiento de las neuritas (axón o dendrita; Peters *et al.*, 1991). Las fibras nerviosas se distribuyen paralelamente unas al lado de las otras a lo largo del gran eje del nervio, como los alambres de un cable de luz que transmiten la señal. Cada fibra nerviosa (neurita(s) + CS) está rodeada por una membrana o lámina basal que entra en relación directa con el tejido conectivo denominado endoneuro o capa perifascicular que les da sostén y apoyo y un lugar por

donde va la red de vasos sanguíneos (Fig. 1A). Paquetes de fibras son agrupadas en fascículos nerviosos rodeados por el perineuro o envoltura lamelar de células perinerales (CP; Peltonen *et al.*, 1987). Las CP se unen por desmosomas y zónulas ocluyentes (*tight junctions*; Nagaoka *et al.*, 1999) se encuentran rodeadas por una membrana basal o lámina basal (Bunge *et al.*, 1982; Jaakkola *et al.*, 1989) presentando alta resistencia mecánica. Son también una barrera entre los fascículos y el exterior impidiendo el paso intercelular de moléculas (Levitan *et al.*, 1983; Bunge *et al.*, 1989; Muona *et al.*, 1992; Todd *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001) y la entrada de patógenos (Walbeehm *et al.*, 2004). Varios fascículos son agrupados por el epineuro o tejido intrafascicular de Ranvier, conformándose el nervio.

La primera descripción del perineuro fue “un tejido como un endotelio mononucleado” lo que hizo pensar que su origen era de tipo epitelial. Este epitelio rodea los troncos nerviosos y sus ramificaciones, desde las raíces espinales y conformarían la piaracnoides

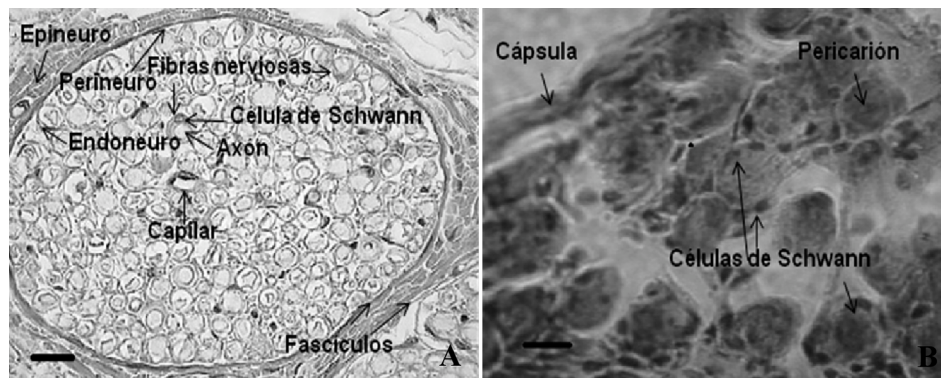


Figura 1. A. Corte transversal de nervio de ratón. En azul se identifica el tejido conectivo, del interior al exterior: el endoneuro, rodea cada fibra nerviosa; el perineuro forma una cubierta de varias células alargadas que reúne las fibras nerviosas y las delimita en fascículo nervioso, aquí se evidencia uno completo y un fragmento del fascículo vecino. El epineuro periférico es un tejido fibroso. Se distingue las células de Schwann únicamente por el núcleo que se encuentra dentro de la fibra cuando el corte pasa a través de este. No se pueden identificar con certitud los fibroblastos en este aumento (Microscopio óptico, coloración pentacromática, Barra 18 μ m). B. Corte de un ganglio de la raíz dorsal de ratón. Se pueden observar las capas de células que componen la cápsula organizada de manera homóloga al perineuro, y las células satélites o de Schwann que delimitan los cuerpos de las neuronas (Microscopio óptico, coloración H y E, Barra 40 μ m).

como un perineuro epitelial (Shanthaveerappa y Bourne, 1966). Sin embargo, los estudios y descripciones histológicas del origen no convencieron. Estas células exhibían características de células en forma de lámina con membrana basal similar a las de las CS, pero presentan características de fibroblastos como su apariencia morfológica y la producción de colágeno tipo I y III; el co-cultivo de CS, neuronas y FE da lugar al perineuro; y al adicionar un marcador retroviral pudieron determinar que la aparición del perineuro estaba asociado con la diferenciación de los FE (Bunge *et al.*, 1989). Se aceptó que el origen de las CP es a partir de fibroblastos durante el desarrollo y en los procesos de regeneración. No obstante, hay que aclarar que las CP *per se* son un tipo celular propio, especializado, que puede mantenerse en cultivo a partir del aislamiento del tejido

perineural de un nervio, como lo demostró Peltonen *et al.*, 1987. Actualmente resurgió la duda de su origen y está en discusión, se propone que los FE provienen de las crestas neurales como las CS y en cultivo dan origen a miofibroblastos (Joseph *et al.*, 2004), y que las CP tienen otro origen, pero no pueden confirmar su origen mesodérmico como dijo Bunge *et al.*, 1989. Pero hay relación directa entre la CP y las CS, ya que éstas últimas secretan señales que regulan la diferenciación del perineuro (Parmantier *et al.*, 1999).

El método generalmente empleado en la regeneración de nervios con pérdida importante de un segmento es el autoinjerto (injerto autólogo). La regeneración nerviosa ha sido estudiada con tubos de diferentes materiales: artificiales y biológicos, en modelos animales con muy pocos casos descritos en humanos. Consiste en suturar los dos muñones (proximal y distal) nerviosos dentro de una guía tubular o prótesis que proporcione un ambiente adecuado para el crecimiento de los axones regenerantes. Dentro de los tubos introducen células, principalmente CS (Bunge, 1994), factores tróficos o elementos de la matriz extracelular (MEC) solos o entremezclados, permitiendo obtener información útil para el diseño de prótesis (Williams y Varón, 1985; Peters *et al.*, 1991; Dick, 1993, Fu y Gordon, 1997; Labrador *et al.*, 1998; Sutachán *et al.*, 1999).

Se han descrito más de 1.500 guías tubulares para la regeneración de nervios donde los mejores resultados se obtienen cuando se emplean CS, comparando el autoinjerto y el empleo de CS autólogas (Kim *et al.*, 1994; Rodríguez A *et al.*, 2000; Perdomo y Camargo, 2001), pero los resultados no son homólogos o reproducibles en las mismas condiciones experimentales. Quizá, porque la fuente de CS es a partir de cultivos en monocapa de GRD o de NP que presentan un 10 a 30% de otros tipos celulares diferentes a las CS (Bunge *et al.*, 1980; Bunge *et al.*, 1982; Guénard *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1995; van den Berg *et al.*, 1995; Muñetón *et al.*, 1998; Perdomo y Camargo, 2001; Evans *et al.*, 2002; Dubový, 2004; Raisman, 2004). Por lo tanto, los FE y las CP no se tienen en cuenta en los estudios de regeneración con cámaras, pero su aporte ha sido estudiado indirectamente por ser contaminantes importantes en los cultivos de CS empleados en las cámaras de regeneración. Los FE podrían tener un papel vital en la regeneración remodelando el tejido conectivo (Jenq *et al.*, 1987; Sutachán *et al.*, 1999; Spilker *et al.*, 2001), teniendo en cuenta que los FE son el 19% de células del endoneuro que remodelan colágeno y otros elementos de la MEC, y favorecen el crecimiento de neuritas, formándoles una guía fibrosa al inicio de la regeneración (Scott *et al.*, 1998; Nagase y Woessner, 1999; Sternlicht y Werb, 2001; Galko y Tessier-Lavigne, 2000; Wong *et al.*, 2001). Sería pertinente incluirlas en una prótesis conociendo el porcentaje de cada una de las células empleadas, aunque esto hasta la fecha no ha sido considerado. Así, Yannas y Hill, 2004, hacen una recopilación de la regeneración en más de 60 prótesis experimentales en animales y en el hombre, en todas se forma un puente fibroso, pero los resultados no son homologables, ni se reproducen los mismos resultados en el mismo grupo experimental, debido a la estandarización de las condiciones de los ensayos, pero concluyen que las CS son esenciales en cualquiera de las prótesis que se analiza.

Tanto, el grado de purificación como la organización de las CS dentro de la prótesis están adquiriendo importancia (Schmalenberg y Uhrich, 2005), al igual que las características básicas de las CS están en pleno desarrollo para entender los mecanismos moleculares de su diferenciación, por ejemplo, inducen células madres o mesenquima-

tosas a CS *in vitro* (Croft y Przyborski, 2009). Las CS del NP dan mejores resultados en la reparación del sistema nervioso central (SNC) que las células gliales del propio SNC (Raisman, 2004), lo que ha llevado a estudiar y caracterizar mejor las CS y su interacción con las neuronas. Las células envoltentes o gliales del epitelio olfativo y las CS que en cultivo presentan la misma morfología, pero, son diferentes al estimular la regeneración del SNC (Takami *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2006). Para obviar las células contaminantes de los cultivos de CS, ahora se emplea una línea de CS en las prótesis (Lago, *et al.*, 2009), pero como toda línea celular es inmortal, y se conoce que no tienen las mismas características celulares que los cultivos primarios (Chatterjee, 2007), en el caso específico de CS además, pueden producir Schwannosis por esto (Giovannini *et al.*, 1999). Las CS de cultivos primarios siguen siendo la herramienta más prometedora, ya que secretan factores, desconocidos aun, que estimulan la regeneración de nervios, y aunque no estén 100% purificadas se está empleando CS autólogas para reparar nervios humanos logrando resultados similares a los del autoinjerto (Hood *et al.*, 2009), los autores consideran que hay mucho por aprender de las CS y dan importancia a que sean altamente purificadas, para estudiar bien los factores bioquímicos y fisiológicos que promueven la regeneración. Todo lo expuesto de las CS y de los FE nos llevó a realizar cultivos primarios de las células del nervio ciático y ganglios de la raíz dorsal lo más purificadas posibles, para ser empleadas en una prótesis de regeneración nerviosa. Aquí se describe el cultivo en monocapa de CS y de células de la cápsula de los GRD; como también de CS, CP y FE del NC, el grado de purificación, la morfología y el análisis morfológico de estos cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE NERVIOS CIÁTICOS (NC) Y GANGLIO DE LA RAÍZ DORSAL (GRD)

El manejo de los ratones ICR de 30 g donados por el Bioterio Experimental de la Universidad Nacional de Colombia, se hizo de acuerdo a las exigencias del *National Research Council*, 1996 y de la legislación colombiana. Se anestesiaron con ketamina 0,25 mg/g (Parke-Davis) y por ratón se extrajeron los 2 NC y los GRD, se colocan en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma) con penicilina 50 µg/mL, estreptomycin 50 U/mL (Gibco) y amfotericina 0,25 µg/mL (Sigma). En los cultivos de CS y de CP se adicionó 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco); lo que llamamos medio completo (MC), para el cultivo de los FE se utilizó MC con 20% de SFB (MC20%). El cultivo primario se realizó en cajas de plástico (Falcon) de 35 mm de diámetro a 37 °C con una atmósfera de CO₂ 5% - aire 95% saturada en humedad.

En la tabla 1 se resumen los tratamientos realizados a los GRD y a los NC; estos fueron divididos en grupos experimentales de la siguiente manera: células provenientes de NC grupos 1 al 9 y células provenientes de GRD grupos 10 al 16, a los cuales se les aplicaron dos tratamientos diferentes, cultivo de explantes (o fragmentos del tejido) y cultivo celular (haciendo disociaciones enzimáticas y mecánicas del tejido). Los grupos a los que hacemos referencia en materiales y métodos son los de esta tabla.

Nervio Ciático	N.º	Grupos experimentales
	1	Explante completo
	2	Explante sin epineuro
	3	Explante endoneuro
	4	Completo disociado
	5	Endoneuro disociado
	6	Endoneuro disociado
	7	Perineuro disociado
	8	Explante perineuro
	9	Explante perineuro 24h a 4 °C

Ganglio Raíz Dorsal	N.º	Grupos experimentales
	10	Explante con cápsula
	11	Explante sin cápsula
	12	Completo disociado
	13	Sin cápsula disociado
	14	*Sin cápsula disociado
	15	Sólo cápsula disociada
	16	**Explante de cápsula

Tabla 1. Resumen de los tratamientos realizados a los ganglios de la raíz dorsal (GRD) y a los nervios ciáticos (NC); estos fueron divididos en grupos experimentales de la siguiente manera: células provenientes de NC grupos 1 al 9 y células provenientes de GRD grupos 10 al 16, a los cuales se les aplicó dos tratamientos diferentes, cultivo de explantes (o fragmentos del tejido) y cultivo celular (haciendo disociaciones enzimáticas y mecánicas del tejido). *Grupo experimental donde se adicionó al cultivo forskolina y toxina colérica. **Grupo experimental donde las células presentan la misma morfología que las células perineurales.

CULTIVO DE EXPLANTES

Los NC completos se cortan en fragmentos de aproximadamente 2 mm y se cultivan (Grupo 1). Los GRD se retiran de los espacios intervertebrales, las raíces nerviosas se cortan y se cultivan enteros (Grupo 10). El cultivo de explantes se inicia con 0,5 mL de MC entre 1/2 y 3 h inicialmente. Se asegura la adhesión del tejido al soporte, y luego se añade MC hasta un volumen de 2 mL. Bajo el microscopio estereoscópico se realiza la microdissección, se separan los compartimentos del NC y se cultivan separadamente: NC sin epineuro (Grupo 2), endoneuro (sin epineuro ni perineuro; Grupo 3). La cápsula se retiró de los GRD, se cultivó explantes de GRD sin cápsula (Grupo 11). Para todos los cultivos el medio se cambia el segundo día y luego cada tercer día.

CULTIVO DE EXPLANTES DE PERINEURO Y DE CÁPSULA DE GRD

Los explantes de perineuro (Grupo 8) se cultivaron en las mismas condiciones del ítem anterior, y otros fragmentos se sometieron a 4 °C por 24 h y luego se cultivaron (Grupo 9). Fragmentos de la cápsula de los GRD se cultivaron (Grupo 16) igual que el Grupo 8.

DISOCIACIÓN Y CULTIVO DE NC Y DE GRD

Se realizó la disociación como fue descrita para nervios humanos, pero no se dejó tiempo (14 días) de degeneración *in vitro* (Calderón-Martínez *et al.*, 2002). La disociación enzimática de los fragmentos descritos en cultivo de explantes, se realizó con colagenasa tipo II 250 U/mL (Sigma) y dispasa 0,1 U/mL (Sigma) en DMEM a 37 °C por 15 min en agitación continua (160 oscilaciones por minuto); en esta misma solución se realizó la disociación mecánica con pipeta Pasteur de vidrio. Las células disociadas se lavan por triplicado a 200 x g por 5 minutos con MC. Sólo para las células disociadas de GRD se filtran a través de mallas de nilón con poros de 100 µm de diámetro, para eliminar los cuerpos de las neuronas. En el momento de la siembra se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con azul Trypan 5%. Las células de los GRD filtradas (Gru-

pos 12, 13 y 14) o de los NC (Grupos 4, 5 y 6), se cultivan en dos cajas de Petri de 35 mm de diámetro con y sin colágeno 0,1 mg/mL (obtenido a partir de tendones de cola de rata según Elsdale y Bard, 1972), en MC y las mismas condiciones ambientales que los explantes. Los grupos 6 y 14 se cultivaron con forskolina 2 μ M (Biovision) y toxina colérica 0,1 μ g/mL (Sigma). El MC se cambia el segundo día y luego cada tercer día. Los fragmentos de perineuro y de cápsula de los GRD no se disocian con la colagenasa II 250 U/mL y dispasa 0,1 U/mL, entonces se ensayaron las enzimas: tripsina 0,25%, 2,5% y 0,5%; dispasa 0,5, 1, 2 y 3 U/mL, y colagenasa II 280, 400, 600 y 800 mU/mL en DMEM, separadas y mezclas de las tres enzimas, resultados que se pueden reunir en los grupos 7 y 15, para perineuro y cápsula de GRD respectivamente. Un vez establecidos los cultivos se hicieron también cultivos en cajas de 24 pozos con laminillas, recubiertas o no de colágeno 0,1 mg/mL para la realizar las pruebas de inmunocitoquímica.

OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS ENDONEURALES Y DÉRMICOS

Se realizó cultivo de explantes de endoneuro con MC20% para verificar el crecimiento de fibroblastos endoneurales (FE) según lo descrito por Leal *et al.*, 2004. También se disoció el endoneuro y GRD sin cápsula con 400 U/mL de colagenasa tipo II y una disociación mecánica más prolongada, se cultivaron en MC20% en las mismas condiciones ambientales anteriores. Se realizó el cultivo de fibroblastos dérmicos (FD) a partir de dermis de ratón y en las mismas condiciones de disociación y de cultivo que los FE. El medio de cultivo se cambia el primer día y luego cada dos días con MC20% hasta obtener confluencia, en general a partir del día 8 (Leal *et al.*, 2004).

MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Cuando los cultivos primarios de CS y FE llegan a confluencia, se lavan dos veces con DMEM, y se incuban 30 min a 37 °C en 4 mL de DMEM con tripsina 2,5 mg/mL (Sigma). Inicialmente se lavaron una vez con MC a 200 g x 5 min, pero luego se observó una mejor viabilidad celular si se lavan tres veces, lo cual se realizó para todos los subcultivos de cultivos. Antes de sembrar, se determina la viabilidad celular por el método de exclusión con azul Trypan 5% y se cuenta el número de células. Luego se inicia el cultivo secundario de las células de los cultivos primarios. También se realizaron cultivos primarios, y los secundarios de 6.000 células/pozo, en cajas de 24 pozos con laminillas recubiertas con y sin colágeno.

INMUNOCITOQUÍMICA

En la inmunocitoquímica se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios (Ac 1): Anti-S100 β (Dako Cytomation) para las CS, que marca una superfamilia de proteínas con unión acídica al calcio, en el SNP es expresada por las CS distribuyéndose en su citoplasma y asociándose a proteínas de membrana (Spreca *et al.*, 1989; Rambotti *et al.*, 1990; Garavito *et al.*, 2001). Ac anti-Thy1.1 (Santacruz biotechnology, Inc.) para fibroblastos, reconoce glicoproteínas de membrana con un tercio glicosilado y el resto constituido por un polipéptido que varía en longitud dependiendo de la especie a la que pertenece (Joseph *et al.*, 2004; Pei *et al.*, 2004). Ac anti-ZO1 (Santacruz biotechnology, Inc.) reconoce proteínas de la unión cerrada o zónula ocluyente (*tight junction or zonula*

occludens) y se empleó para determinar las células perineurales, cuya característica es la presencia de estas uniones entre ellas (Pummi *et al.*, 2004). Los controles positivos fueron cortes de GRD y de NC de ratón para todos los marcadores. Los controles negativos, los mismos cultivos sin Ac 1. El control negativo de estos marcadores en cultivo, se hizo en monocapas de macrófagos murinos línea J774A.1 (ATCC).

Para obtener GRD y NC, el ratón se perfundió por 3 min con paraformaldehído 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4 vía intracardíaca a 260 mm Hg. Los cultivos se lavan con PBS 0,1 M, pH 7,4 y se fijan con paraformaldehído 4%. La fijación dura 30 min para los cultivos y 1 h para tejido completo. Se lava tres veces con PBS 0,1 M, pH 7,4 y luego se incuban con glicina por 30 min los cultivos y 1 h los tejidos. El procesamiento para los tejidos se hizo de acuerdo a lo descrito para la inclusión en parafina (Luna, 1960) Se hicieron cortes (5 µm de grosor) colocados sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y luego se desparafinaron.

Los cultivos y los tejidos se permeabilizaron con Tritón x100 (0,1% en PBS) 30 min a 20 °C, se bloquearon los sitios inespecíficos con SFB 3% en Tris HCl pH 8,6, se incubó con el Ac 1 1h a 37 °C (1:500 para S100β; 1:100 para Thy1.1 y ZO1) y el Ac secundario 1:200 IgG anti-conejo (Vectastain) 30 min a 37 °C. Se continúa 45 min con ABC-peroxidasa (A-B, Vectastain), y se colorearon con Hemalun de Meyer (Bernal *et al.*, 2007) y además para los fibroblastos con Alexa Flour (Molecular Probes).

OBSERVACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis y seguimiento de los cultivos se hizo en microscopio invertido y para las técnicas de inmunocitoquímica con microscopio convencional. El número total de células que crecen y el número de CS, FE o FD se determinó en 20 campos al azar en cada uno de los grupos, con base a la morfología de las células en el día 8 para el cultivo primario y secundario. La pureza de los cultivos ya sea de CS, o de FE o de CP fue evaluada como el porcentaje promedio de células con respecto al número total de células contadas $\% \pm$ desviación estándar, N=4 experimentos (se indica cuando el N es diferente de 4; Levi, 1996). Para el análisis de viabilidad celular y de la purificación de los cultivos obtenidos se realizó el *test* de t de Student.

RESULTADOS

La tabla 2 resume los resultados más relevantes en los cultivos primarios de los diferentes grupos experimentales de la tabla 1 a partir de nervio ciático y ganglio de la raíz dorsal de ratón. Los grupos a los que hacemos referencia en resultados y discusión son los de la tabla 2.

CULTIVO DE EXPLANTES

En los explantes de NC completo (Grupo 1), las CS migran entre el segundo y tercer día de cultivo y los FE se observan al cuarto o quinto día, con una proliferación lenta. La confluencia de este cultivo se alcanza a los 20 días, tiempo en el cual se presenta una proporción de 60% FE y 40% CS. De seis ensayos que se hicieron en las mismas condiciones, en uno se obtuvo un cultivo predominante de FE al tercer y cuarto sub-cultivo. En los explantes sin epineuro (Grupo 2) crecen 20% CP, 60% CS y 20% FE y alcanzan la

confluencia entre 14 a 15 días. En los explantes de endoneuro (Grupo 3) crecen 10% CP, 60% CS y 30% FE y alcanzan la confluencia a los 14 días. En el cultivo primario se observan mezcla de tres tipos celulares principales: CS, FE y CP. En el sub-cultivo no se observó CP, pero si una mezcla de CS y FE, predominando las CS.

	N.º	Grupos experimentales	% CS	% CP	% FE	% Neuronas	% NI	Confluencia, días
Nervio ciático	1	Explante completo	60	NO	40			20
	2	Explante sin epineuro	60	20	20			14 ó 15
	3	Explante endoneuro	60	10	30			12
	4	Completo disociado	70±4,2	10	15		5	8 ó 9
	5	Endoneuro disociado	90±3	3	5		2	11
	6	* Endoneuro disociado	95±3,5	NO	4		1	6 ó 7
	7	Perineuro disociado	NO	NO	NO			NO
	8	Explante perineuro	3	97±0,5	2		1	14
	9	Explante perineuro 24h a 4°C	NO	99±0,5	NO		1	19
Ganglio Raíz Dorsal	10	Explante con cápsula	NO	NO	NO			NO
	11	Explante sin cápsula	NO	NO	NO			NO
	12	Completo disociado	85±4	10	5	1		9
	13	Sin cápsula disociado	94±3	0	5	1		10 ó 11
	14	* Sin cápsula disociado	98±2	NO	1	1		6 ó 7
	15	Sólo cápsula disociada	NO	NO	NO			NO
	16	** Explante de cápsula	3	95±0,5	2		2	19

Tabla 2. Cultivo primario a partir de los grupos experimentales descritos en la tabla 1. Los resultados presentados indican los porcentajes de los diferentes tipos de células que crecen y el número de días para llegar a confluencia en cultivo primarios. Estos porcentajes fueron obtenidos contando el número y tipo celular en 20 campos diferentes por experimento con microscopio óptico a 200x (\pm DS, N=4 experimentos). %: porcentaje de purificación; CS: Células de Schwann; CP: Células Perineurales; FE: Fibroblastos Endoneurales; NI: No identificadas. *Cultivo con forskolina y toxina colérica. **Células que presentan la misma morfología que las CP.

CULTIVO DE EXPLANTES DE PERINEURO Y DE CÁPSULA DE GRD

No se disocian las células de los explantes de perineuro o de la cápsula del GRD con las diferentes concentraciones enzimáticas empleadas y descritas en materiales y métodos siendo representativo de estos ensayos los Grupos 7 y 15. Los fragmentos después de esta disociación son viables en su gran mayoría, y excepcionalmente se adhieren y crecen pocas células que mueren en los primeros días. Tampoco crecen células cuando se cultivan los GRD completos (Grupo 10) o sin cápsula (Grupo 11). Aunque no hay proliferación se conserva la viabilidad celular, ya que al contrastar con un flourocromo vital (flourogold) los GRD con o sin cápsula conservan la fluorescencia durante seis días de cultivo; además, estos fragmentos cultivados al realizar el examen de exclusión con azul Trypan sólo las células periféricas son azules y las del interior son translúcidas, lo que demuestra que las células en el interior del GRD son viables.

El cultivo de células del perineuro y de la cápsula de GRD se logró únicamente con los explantes de estos tejidos (Grupos 8, 9 y 16). Presentan una gran dificultad para adherirse a la superficie de la caja de cultivo plástica, de vidrio o recubierta de colágeno, y no crecen sobre colágeno.

Cuando los fragmentos se cultivan desde el inicio con 2 mL de medio, flotan y no se adhieren al soporte por las vibraciones del ventilador de la incubadora, por lo que fue necesario cultivar al inicio (al menos 4 h) con poco medio para evitar su movimiento y favorecer así adherencia al soporte, logrando una buena interferencia entre aire y medio de cultivo. Fue interesante, el inicio de la migración y crecimiento de las células a partir explantes de cápsula de GRD y de perineuro de NC se observa a partir del día 14 en los dos casos, se hicieron diez experimentos para poder confirmar que el inicio de la migración de las CP y capsulares sobre el soporte de la caja de cultivo es este día. Las CP son de gran tamaño, con núcleos dos a tres veces el de un FE, con forma poligonal (Fig. 2B; Fig. 2C), crecen unas al lado de las otras en vidrio o plástico. El cultivo primario de CP difiere de los cultivos primarios clásicos en monocapa porque crecen sobreponiéndose unas a otras dando lugar a una estructura estratificada de células (Fig. 2B; Fig. 2C), después del inicio de la migración (14 días de cultivo primario), llegan rápidamente a confluencia en cinco días donde no proliferan más y no cubren completamente la superficie del soporte de cultivo. Para realizar el sub-cultivo se realizó la tripsinización y todo el cultivo se desprende como una sola “lámina o cubierta”, resistente a la tracción mecánica y física como el perineuro recién disecado y no proliferan en cultivos secundarios o sub-cultivos. Esta “lámina” se pudo manipular como un tejido fresco que se fijó, deshidrató e impregnó en parafina y se pudieron realizar cortes de 5 μm de espesor (Fig. 2D). Tanto las CP (Fig. 2D) o capsulares (Fig. 2B) en cultivo o en los cortes de parafina de la “lámina” de CP muestran que son ZO1 positivas; manifestando que los dos tipos de células son homologables. Estas células no se marcan con Ac anti-queratina (Fig. 2C) y Ac anti-vimentina, cuya imagen es similar al control negativo de la inmunocitoquímica. La inmunocitoquímica confirma los resultados morfológicos y el porcentaje de purificación observados con microscopio invertido.

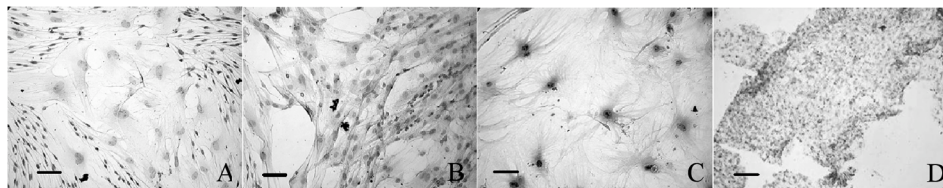


Figura 2. A. Cultivo (14 d) de ganglio de la raíz dorsal (GRD) sin descapsular disociado con collagenasa (Grupo 12). En el centro se aprecian las células de la cápsula con morfología de células perineurales. Control negativo de inmunocitoquímica. B. inmunocitoquímica con Ac anti-ZO1 del cultivo (12d) de explante de la cápsula de GRD. Se aprecian grandes células y muy planas. C. Inmunocitoquímica con Ac anti-queratina del cultivo (12d) de explante de perineuro, se aprecia que no está presente estos filamentos (Grupo 8, imagen similar al Grupo 9). Se aprecian las células perineurales que cubren una gran superficie del soporte y algunas binucleadas. La imagen es la misma para el control negativo o inmunocitoquímica con Ac anti-vimentina. D. Corte de 5 μm de espesor del cultivo primario (14d) de explante de perineuro retirado de la caja de cultivo e impregnado en parafina. El aspecto es de una “lámina” de varias capas de células perineurales, mostrando su fuerte adhesión entre ellas y que son ZO1 positivas (Microscopio óptico, Barra: A y C. 80 μm , B. 60 μm , D. 160 μm).

La purificación de CP se vio favorecida con 24 h a 4 °C (Levi *et al.*, 1994a) antes de iniciar el cultivo de explantes, obteniendo $99\% \pm 0,5$ de CP (Grupo 9) comparado con $97 \pm 0,5$ (Grupo 8) cultivado inmediatamente después de la disección, pero esta diferencia no es significativa ($p \leq 0,6$).

CULTIVO DE ENDONEURO Y GRD SIN CÁPSULA DISOCIADOS ENZIMÁTICAMENTE PARA OBTENER CÉLULAS DE SCHWANN

Cuando se realizó el cultivo de CS a partir de GRD completos disociados (Grupo 12) como lo describen la literatura (Chi *et al.*, 1993) y al desprenderlas para el sub-cultivo, se observó en la superficie plástica una capa de células con morfología de CP descrita por Peltonen *et al.*, 1987, e idénticas a las obtenidas en nuestros cultivos de explantes del perineuro. Esto demuestra que estos cultivos son mezcla de CS y células de la cápsula. Por esto, se comparó el cultivo de GRD con y sin cápsula disociados enzimáticamente. Evidentemente, aparecen las células de la cápsula en el grupo no microdisectado (Fig. 2A) confirmándose que la morfología es la misma de las CP. Para evitar otros tipos celulares y obtener sólo CS, se eliminó por microdisección la cápsula de los GRD y se cultivaron fragmentos donde crecieron células con la morfología típica de CP y ZO1 positivas (Fig. 2B), como se describió en el anterior ítem.

La morfología que presentan los cultivos de NC sin epineuro y disociado (Grupo 4) permite identificar los tres tipos celulares que crecen: CS, FE y CP (Fig. 3A) y del GRD completo y disociado (Grupo 12; Fig. 3B). Las CS fueron identificadas en base a su morfología en microscopio invertido inicialmente, y fueron seleccionadas como aquellas que presentaban forma bipolar, con procesos largos, núcleo ovoide y refringentes en el centro celular (Fig. 3, flechas blancas); mientras que los fibroblastos fueron identificados como células más aplanadas, irregulares con varias prolongaciones y con un gran núcleo redondo y sin refringencia en el centro (Fig. 3, flechas negras).

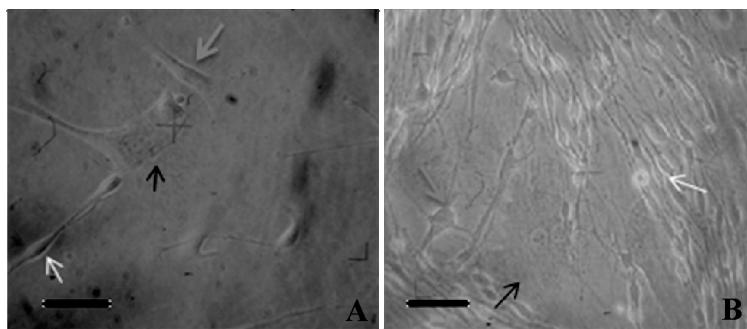


Figura 3. A. Cultivo (3d) de células de nervio ciático sin epineuro y disociado con colagenasa (Grupo 2). Flecha blanca: célula de Schwann (CS). Flecha negra: célula perineural (CP). Flecha roja: fibroblasto endoneural (FE). Se evidencia la gran superficie que cubre la CP en comparación con el FE y se aprecian bien ahusada a la CS y refringente en la región central. B. Cultivo (4d) de ganglio de la raíz dorsal sin descapsular y disociado con colagenasa (Grupo 12). Se evidencian los mismos tipos celulares que en A, la flecha blanca: CS, la flecha roja: fibroblastos, y la flecha negra: célula de la cápsula que presenta la misma morfología que la CP (Microscopio invertido, Barra: A. 50 μ m, B. 60 μ m).

La obtención de CS altamente purificadas se logró con el endoneuro del NC y los GRD descapsulados que fueron disociados enzimática y mecánicamente sin exceder 15 min. Muchos autores sugieren la necesidad de soportes de elementos de la matriz extracelular para obtener CS en cultivo. En cuanto a los substratos aquí utilizados, si bien el colágeno permitió una mejor adhesión inicial; las cajas de plástico o vidrio sin ninguna cubierta fueron igual de efectivas en el establecimiento de los cultivos purificados de CS (Fig. 4A),

contrario a lo que se esperaba. Los cultivos realizados sobre plástico o vidrio alcanzaron rápidamente la misma confluencia a los realizados sobre colágeno (Fig. 4B). La única diferencia observada entre los sustratos, es que las CS sobre plástico o vidrio presentan una morfología más expandida sobre el soporte. Se obtuvo un número aproximado de $1,4 \times 10^6$ células con una pureza del $94\% \pm 3$ en tan sólo 10 a 11 días de cultivo a partir de GRD de un ratón (Fig. 5A; Fig. 5B) o $90\% \pm 3$ de los dos NC de ratón (Grupos 5 y 13; Fig. 5C).

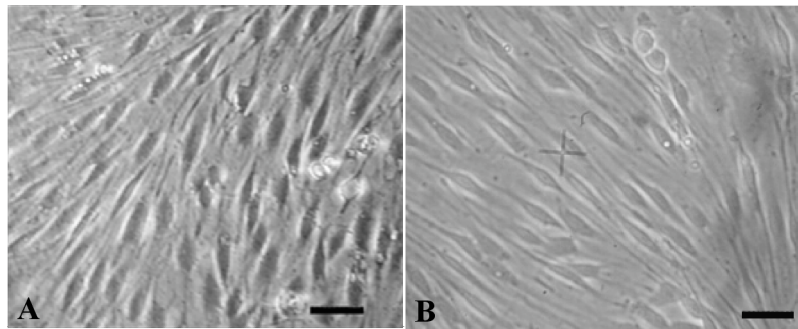


Figura 4. Cultivo (11d) de endoneuro (sin epineuro ni perineuro) del nervio ciático disociado con collagenasa y dispasa (Grupo 5, imagen similar a los grupos 6, 11 y 12). En A. Las células de Schwann (CS) crecen sobre plástico mostrando menos refringencia en el centro que en B pero son ahusadas y crecen en cordones, forma típica de las CS. En B. las CS sobre colágeno (0,5 mg/mL) muestran su forma ahusada y bien refringente en el centro. En ambas microfotografías se puede apreciar el grado de purificación de CS (Microscopio invertido, Barra: 30 μ m).

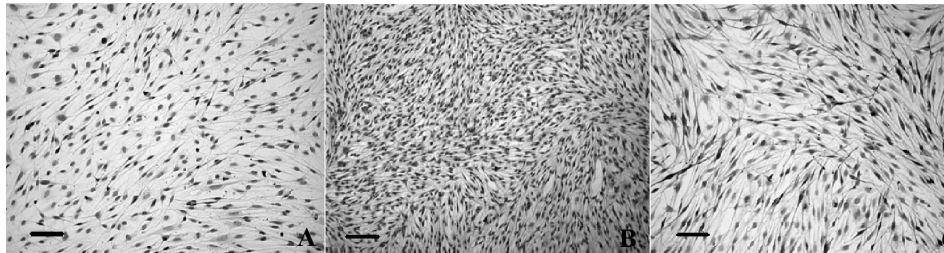


Figura 5. Cultivo (11d) de ganglio de la raíz dorsal descapsulado y disociado con collagenasa, en A. control negativo de inmunocitoquímica, se aprecian las células de Schwann (CS) que cubren la superficie de la caja de cultivo (Grupo 12, imagen similar a los grupos 5, 6 y 11). B. Inmunocitoquímica con Ac anti-S100 β , se aprecia todas las CS marcadas (Grupo 11, imagen similar al grupo 12). C. Inmunocitoquímica con Ac anti-S100 β de las CS de endoneuro de nervio ciático sin epineuro ni perineuro disociado con collagenasa y dispasa (Grupo 6, imagen similar al Grupo 5); se aprecia que no todas las CS se marcan con este anticuerpo aunque tengan la misma morfología ahusada (Microscopio óptico, Barra: A y C. 60 μ m, B. 80 μ m).

Cuando se adiciona forskolina y toxina colérica, mitógenos para las CS, el crecimiento y confluencia es a los seis días (Grupos 6 y 14) y el grado de purificación de los cultivos desde el cultivo primario es más elevado que sin mitógenos, siendo $95\% \pm 3,5$ de CS de NC y $98\% \pm 2$ de CS de GRD (Fig. 5B). En el primer sub-cultivo $90\% \pm 2$ (N=6); en el segundo sub-cultivo $96\% \pm 2$ (N=6) y en el tercer sub-cultivo $99\% \pm 2$ (N=6). Con una

excelente viabilidad presentada en los sub-cultivos: primer sub-cultivo $97\% \pm 2$ (N=3) y segundo sub-cultivo $95\% \pm 2$ (N=3); se mejora la viabilidad $98\% \pm 3$ (N=3) cuando se lavan tres veces antes de iniciar el primer sub-cultivo.

Las CS de NC (Fig. 5B) y CS de GRD (Fig. 5C) marcan con el Ac anti-S100, aunque no todas las CS del NC marcan con este anticuerpo; además, el cultivo primario de CS de GRD presenta un porcentaje de purificación mayor (Grupo 5) que las CS de NC (Grupo 13); igual que con mitógenos, grupos 6 y 14 respectivamente. Las inmunocitoquímicas corroboran el grado de purificación de CS observado con microscopio invertido. Esta purificación es importante en el momento de emplear CS autólogas en las prótesis de regeneración (Hood *et al.*, 2009).

OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS ENDONEURALES Y DÉRMICOS

Para acelerar la proliferación y el número de fibroblastos en los cultivos primarios de explantes del endoneuro como en los cultivos secundarios o sub-cultivos, se añadió 20% de SBF, lográndose una confluencia a los 12 días en el cultivo primario y un número menor de CS contaminantes. La utilización de este suplemento de SBF redujo en ocho días el tiempo de cultivo primario de los FE en relación a los mantenidos con SBF al 10% y se evita la contaminación por CS (Flechas, Fig. 6A) con explantes.

Se modificó la técnica de obtención de explantes de endoneuro (Fig. 6A) y su cultivo, para lograr en corto tiempo un mayor número de FE en el cultivo primario y evitar una población sin CS en los sub-cultivos. La primera modificación, fue eliminar perineuro y epineuro. La segunda, realizar una disociación enzimática y mecánica muy controlada. Así, la adhesión de los FE al soporte en el cultivo primario se observó desde el primer día de cultivo. Lo más importante fue lograr una rápida purificación de la población de FE y la eliminación de las CS en los cultivos secundarios, cada sub-cultivo dura aproximadamente cuatro días. A partir de este momento, los cultivos secundarios fueron empleados para propagar los FE y obtener un mayor número. Este mismo procedimiento se realizó con los GRD sin cápsula obteniendo los resultados similares (Fig. 6B).

La identificación con el Ac anti-Thy1.1 de los cultivos primarios de FE fue tenue (Fig. 6C), como ocurrió en el NC completo. Para corroborar su identificación se hizo el mismo marcaje en fibroblastos dérmicos (FD; Fig. 6D), se evidenció mejor empleando el segundo Ac fluorescente y una observación en microscopio confocal de los FE (Fig. 6E) y de los FD (Fig. 6F). Los controles negativos no presentaron ningún marcaje cuando se realizó sólo con el Ac primario, como tampoco con Ac anti-Thy1.1 en cultivo de macrófagos murinos. Aunque se logró identificar los diferentes tipos celulares, encontramos células con aspecto entre FE y CP y en otras ocasiones FE se marcaban con el Ac anti-S100 β , y células similares a CP sin ser tan extensas en su superficie con marcaje alrededor del núcleo con Ac anti-S100 β ; hubo CP y pocas CS marcadas con el Ac anti-Thy1.1, lo que determinamos como células no identificadas (Tabla 2).

DISCUSIÓN

CULTIVO DE EXPLANTES

El cultivo de CS se hizo inicialmente por explantes de nervios periféricos (Morrissey *et al.*, 1991), donde se dejan entre siete a 14 días en la caja de cultivo (llamado también

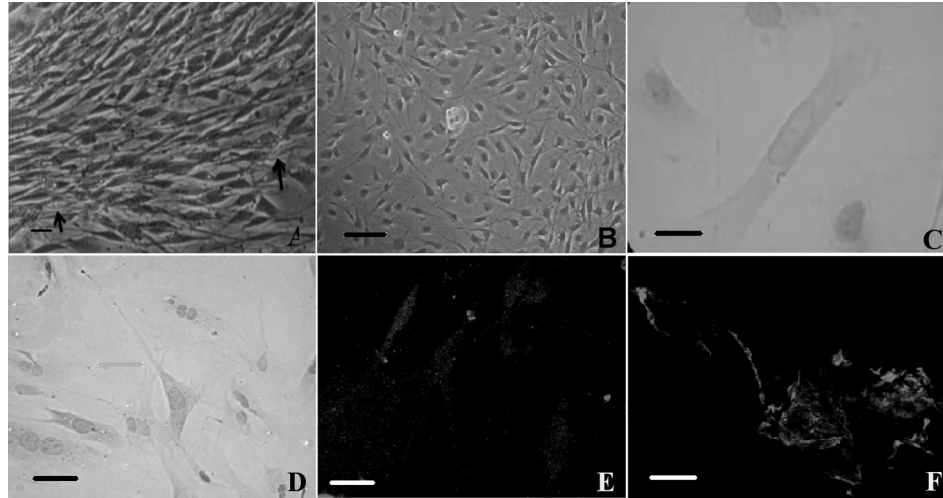


Figura 6. A. Cultivo (8d) de células a partir de explante de endoneuro de nervio ciático sin epineuro ni perineuro no disociado en medio DMEM con 20% de suero fetal bovino (SFB). Se observa que los fibroblastos endoneuriales (FE) tienen forma piramidal, nótese que proliferan algunas células de Schwann (flechas) bien refringentes. B. Cultivo (7d) con 20% de SFB de ganglio de la raíz dorsal (GRD) descapsulado y disociado con collagenasa. Se puede apreciar a los fibroblastos con la misma morfología piramidal que los FE. Esta misma imagen se observa con el endoneuro (Leal *et al.*, 2004) en las mismas condiciones de disociación que en B. C. y D. Inmunocytoquímica con Ac anti-Thy1.1 y anticuerpo secundario revelado con peroxidasa: C. cultivo de células del endoneuro (3d), y D. de fibroblastos de la dermis (FD) obtenidas en las mismas condiciones de disociación y cultivo que C, se aprecia la forma piramidal de los fibroblastos dérmicos. E. y F. Inmunocytoquímica con Ac anti-Thy1.1 y Ac secundario fluorescente de cultivo (3d) similar a C y D respectivamente, se aprecia que la distribución de Thy1.1 en los FE es periférica y homogénea, mientras que en los FD se evidencia un mayor marcaje (A y B Microscopio invertido, Barra: A 30 μ m y B. 20 μ m. C y D Microscopio óptico, Barra: C 5 μ m y D 10 μ m. E y F Microscopio confocal, Barra: E y F 5 μ m).

tiempo de degeneración *in vitro*). Las células migran después de los siete días y forman una monocapa de células donde predominan las CS (Morrissey *et al.*, 1991). Es en los cultivos secundarios que logran un alto grado de purificación pero no más del 80%. Nosotros no obtuvimos una alta purificación de CS por este método de cultivo (Grupos 1, 2 y 3). En las mismas condiciones descritas aquí, pero en NC de rata adulta hay, dos picos de proliferación de las CS a los siete y 15 días, tiempo en el cual se logra obtener de los explantes mayor número de CS 60 a 70% (Garavito *et al.*, 2001), de forma similar a nuestros resultados.

El no obtener cultivo celular a partir de explantes de GRD con y sin cápsula (Grupos 10 y 11) podría deberse a que la migración sea impedida por el tejido conectivo o adiposo que rodea al GRD pues quedan vestigios de estas células, o simplemente al hecho de quedar conservados en su estructura tisular no requieren dividirse para sobrevivir en monocapa de manera homóloga a folículos de tiroides (Spinel *et al.*, 1990; Herrera *et al.*, 2008) o a acini de glándulas salivales (Victoria *et al.*, 2007) donde las células son viables a largo plazo del cultivo (12 días folículos y nueve días *acini*) aún impidiendo la adhesión celular con agarosa, el número de células y su viabilidad se mantiene constante a lo largo del cultivo y no hay proliferación, como en los GRD que al ser contrastados

con un fluorocromo vital conservan la fluorescencia los seis días que se dejan en cultivo; además se demuestra que las células dentro de los GRD son viables. Con el cultivo de explantes se pueden obtener CS pobremente purificadas.

CULTIVO DE EXPLANTES DE PERINEURO Y DE CÁPSULA DE GRD

El tejido perineural es un tejido “conectivo” compacto de alta resistencia y además elástico (Levitan *et al.*, 1983) gracias a las uniones cerradas o zónulas ocluyentes (*tight junctions*) (Kanda *et al.*, 2004; Pummi *et al.*, 2004), a las uniones comunicantes (*gap junctions*) (Nagaoka *et al.*, 1999) y a los desmosomas entre las células. La superposición de láminas celulares concéntricas que forman los fascículos del nervio, es regulado por uniones con las láminas basales y por proyecciones celulares desde una lamela a otra (Smith *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004), lo que explicaría la dificultad en disociar las CP y que no crezcan *in vitro* a partir de los fragmentos que se forman después de la disociación, o quizá los requerimientos de cultivo cuando están “disociadas” no son adecuados en las condiciones sencillas de este trabajo. Estos fragmentos disociados con enzimas, tal vez pierden muchos de sus elementos de la membrana basal indispensables para unirlos y aglutinar las CP (Jaakkola *et al.*, 1989).

El cultivo primario de CP sólo se obtuvo con explantes del perineuro y con la cápsula de GRD, las células migran y crecen a partir de explantes enteros a los 14 días como lo describió Peltonen *et al.*, 1987. Ellos describe que las CP *in vitro* crecen lentamente y para la migración celular es necesario replantar el mismo explante casi diez veces, demostrándose la dificultad de cultivar este tipo celular y tal vez por esto hay muy poca literatura sobre el tema. Los estudios posteriores a Peltonen *et al.*, 1987, se basaron en cultivo de fibroblastos que se diferenciaban en CP o en estudios *in vivo* sobre las capas perineurales (Joseph *et al.*, 2004). El origen de la CP de GRD se asocia con el tejido conectivo de las meninges (Mirsky y Jessen, 1999a) pero no hay reportes detallados en la literatura de cultivos sobre este tejido, siendo escasa la información. Mientras que el origen de las CP de nervio está en discusión, si son endoteliales, epiteliales, de CS o de FE o independiente de CS y de FE (Shanthaveerappa y Bourne, 1966; Peltonen *et al.*, 1987; Jaakkola *et al.*, 1989; Popovic *et al.*, 1994; Rosenbaum *et al.*, 1995; Popovic *et al.*, 2000).

La naturaleza de los filamentos intermedios se conserva desde muy temprano durante el desarrollo embrionario (Rodríguez *et al.*, 2000) y aún en células metastásicas se conserva el origen de los filamentos intermedios y se emplean como marcadores en patología para determinar el origen de células metastásicas (Mindan *et al.*, 1996); ya que las CP no expresan los filamentos intermedios de queratina y vimentina, no tendrían origen epitelial ni mesenquimal.

Cualesquiera que sea su origen, demostramos que es posible cultivar CP de origen de NC y de GRD con alto porcentaje de purificación 98 a 99%. El éxito del cultivo primario de CP es la microdissección y un cultivo inicial de explantes de perineuro y de la cápsula de GRD de unas horas con poco medio de cultivo (0,5 mL).

CULTIVO DE ENDONEURO Y GRD SIN CÁPSULA DISOCIADOS ENZIMÁTICAMENTE PARA OBTENER CÉLULAS DE SCHWANN

Al igual que las células satélites de GRD son consideradas CS en cultivo (Chi *et al.*, 1993, Bernal *et al.*, 2007). Son muchos los grupos que hacen cultivo de CS y describen las

características indispensables de estas células para emplearlas en prótesis nerviosas (Levi *et al.*, 1994b).

La obtención de CS se realizó con el endoneuro del NC y los GRD descapsulados gracias a la disociación en base al cultivo de CS de nervio humano (Calderón-Martínez *et al.*, 2002), modificando y eliminando el tiempo de degeneración inicial (14 días); además, al eliminar la cápsula de los GRD y el epineuro y perineuro del NC el tiempo de disociación enzimática se redujo a 15 min; acortar el tiempo de extracción del tejido y el inicio del cultivo son importantes para tener éxito en el cultivo (Ansselin *et al.*, 1998), ya que la viabilidad disminuye cuando las células son sometidas a tiempos altos de exposición a la enzima, como se ve en los trabajos de Muñetón *et al.*, 1998, quienes obtuvieron en los mejores casos una viabilidad de 88% al utilizar un tiempo de digestión enzimática de una hora y media. Aquí se describe el cultivo primario con resultados similares para CS de NC o de GRD, logrando un 95 a 98% de purificación.

Han sido numerosos los sustratos empleados para promover la proliferación y la purificación de las CS (Vleggeert-Lankamp *et al.*, 2004), los más usados son el colágeno tipo I (Askanas *et al.*, 1980; Chi *et al.*, 1993; Muñetón *et al.*, 1998; Calderón-Martínez *et al.*, 2002) y la poli-L-lisina (Levi, 1996; Rodríguez A *et al.*, 2000) entre otros, pero todos los autores afirman que el uso de una cubierta o elementos de adhesión como soporte es indispensable para la obtención de estos cultivos. La única diferencia que observamos es que las CS sobre plástico o vidrio presentan una morfología más extendida sobre la superficie, probablemente porque no brindan sitios de unión tan fuertes para las células como el colágeno que aún las cancerosas adquieren una morfología de *in vivo* con colágeno como sustrato (Yang *et al.*, 1980), y se conoce que las células establecen un número mayor de uniones célula-sustrato y célula-célula, lo que hace que disminuya la refringencia del centro celular sobre vidrio o plástico.

Demostramos que las CS de nervio de ratón no son tan dependientes de factores mitogénicos específicos ni de colágeno para su proliferación como las células de rata adulta (Garavito *et al.*, 2000a; Garavito *et al.*, 2001) o de nervio humano (Calderón-Martínez *et al.*, 2002), ya que crecen sin forskolina y toxina colérica, sobre vidrio o plástico, aunque sí con mayor rapidez que sin estos mitógenos (Bernal *et al.*, 2007). En cultivo primario sin mitogénicos se obtuvo $90\% \pm 3$ de CS a partir de NC y $94\% \pm 3$ a partir de GRD en comparación con 70% descrito a partir de nervio de rata (Garavito *et al.*, 2001) o de nervio humano (Calderón-Martínez *et al.*, 2002). Con mitogénicos se logró un porcentaje mayor $95\% \pm 3,5$ de CS a partir de NC pero similar al descrito en la literatura, 85% en rata (Garavito *et al.*, 2000b; Garavito *et al.*, 2001) y 95% en nervio humano (Calderón-Martínez *et al.*, 2002), pero el efecto de los mitógenos fue notorio en la CS de GRD siendo el mayor porcentaje de purificación: $98\% \pm 2$.

Generalmente, las células luego de una disociación enzimática son lavadas una o dos veces, pero se sabe que si no se añade inhibidor de tripsina se tiene que lavar tres veces con medio que contenga suero o albúmina fetal para eliminar el efecto de la tripsina que queda en las proteínas de la membrana plasmática de las células (De Meyzô *et al.*, 1986). Por eso realizamos tres lavados con mejores resultados en los sub-cultivo de CS, como también para eliminar las trazas de clostripaina (homóloga a la tripsina) que contiene la colagenasa tipo II que se empleó en la disociación para el cultivo primario. Las CS de NC (Fig. 5B) y CS de GRD (Fig. 5C) marcan con el Ac anti-S100, pero no

todas las CS del NC marcan con este anticuerpo, como fue descrito por Garavito *et al.*, 2000b, en rata. Se corrobora con las inmunocitoquímicas que el cultivo primario de CS de GRD presenta un porcentaje de purificación mayor (Grupo 5) que las CS de NC (Grupo 13); igual que con mitógenos, grupos 6 y 14 respectivamente. Es posible que la presencia de algunas neuronas sensoriales en el cultivo incremente la proliferación de las CS (Wood y Bunge, 1975; Zhang *et al.*, 1994), pues queda una que otra neurona. Los agentes que elevan el AMPc favorecen esta purificación, pero no son necesarios y sí inconvenientes para emplear las CS en prótesis de nervios. En conclusión, logramos una alta purificación de CS en cultivos primarios a partir de NC o GRD favorecidos por la microdissección antes de la disociación enzimática, en tiempos muchos más cortos que los descritos en la literatura.

OBTENCIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS ENDONEURALES Y DÉRMICOS

El crecimiento de los FE se vio favorecido por la digestión más severa (mayor concentración de colagenasa y el doble de tiempo en la disociación mecánica) que la empleada para el endoneuro de NC y GRD sin cápsula.

Se conoce que la proliferación de las células en los cultivos depende de la concentración de SBF que se le añade al medio (Denef *et al.*, 1980), y que los fibroblastos responden más eficazmente a los factores presentes en el suero que las CS (Leal *et al.*, 2004; Nadri y Soleimani, 2007). Probablemente el resultado con 20% de SBF se debe a la similitud en componentes del SBF y de la sustancia amorfa del tejido conectivo (Leal *et al.*, 2004), que es el medio en el que se encuentran los fibroblastos *in vivo*, ayudando de esa manera a la proliferación y supervivencia de estas células cuando están en cultivo (Hillmann *et al.*, 1999); puesto que este efecto no es observado en cultivos de otros tipos celulares como las CS o células de tiroides (Denef *et al.*, 1980; Spinel *et al.*, 1990; Perdomo y Camargo, 2001). Aunque son muchas las técnicas descritas para cultivo de fibroblastos, principalmente dérmicos, Knoops *et al.*, 1990, trabajaron con fibroblastos de nervio sin describir el origen específico del tejido conectivo del nervio que utilizaron, y además, es una metodología costosa. Al eliminar perineuro y epineuro, y emplear el endoneuro y al eliminar la cápsula de los GRD, podemos asegurar en un alto porcentaje el origen de los FE en nuestros cultivos.

La disociación enzimática que empleamos se basó en la disociación descrita para células endocrinas con colagenasa tipo II seguida de la disociación mecánica controlada (Spinel *et al.*, 1990) que fue inicialmente empleada para CS humanas (Calderón-Martínez *et al.*, 2002) y se lavó con MC20% para eliminar mejor el efecto de las trazas de clostripaina de la colagenasa tipo II. Además, se hizo muy controlada para evitar la pérdida de proteínas de membrana implicadas en adhesión celular (Karlsson *et al.*, 1982; Albert *et al.*, 2002). El crecimiento de los FE con el método de explantes se demora entre 20 días a un mes para formar la monocapa y con 20% de SBF a partir de 8 d (Leal *et al.*, 2004); con la introducción de la disección del nervio y disociación del endoneuro se obtuvo confluencia a los cinco días de cultivo, empleando también 20% de SBF.

Como Thy 1.1 se expresa en células con fenotipo miofibroblástico de nervio, es utilizado como un marcador selectivo para fibroblastos de nervio, entre los cuales se puede incluir los FE, que presentan un fenotipo contráctil al estar en cultivos en monocapa (Campbell *et al.*, 1981; Chang *et al.*, 1985; Joseph *et al.*, 2004). Además, esto quizá se debe también

a que aún no se conoce el origen de los FE, por lo que estas dos líneas celulares comparten el mismo origen ectodérmico a partir de células madre no neuronales de la cresta neural (Siironen *et al.*, 1992; Joseph *et al.*, 2004), y puede significar que las proteínas de unión a calcio (S100 β) tienen una distribución más ubicua de lo que se piensa, expresándose en las células provenientes de nervio tanto con morfología de Schwann como en aquellas con morfología fibroblástica, pero incluso se expresó levemente en tirocitos en cultivo, lo que confirma su ubicuidad.

CONCLUSIONES

En conclusión, se ha logrado obtener cultivos primarios de células de Schwann, células perineurales y fibroblastos endonurales altamente purificados. Esto se logró principalmente por dos hechos: 1. se pudo acortar máximo a 30 min el tiempo entre la obtención del tejido y el inicio del cultivo. 2. La microdissección de los diferentes tejidos del nervio y del ganglio de la raíz dorsal, son esenciales para asegurarse el origen celular y lograr un mejor control de la disociación de los tejidos.

Las células de Schwann altamente purificadas de NC o de GRD crecen en cultivos primarios sobre plástico, vidrio o colágeno y sin necesidad de agentes mitogénicos. Las células de la cápsula de GRD en cultivo primario tienen las mismas características de las células perineurales y pueden ser consideradas como tales. Las células perineurales sólo crecen en cultivos primarios a partir de explantes y forman una "lámina" de células estratificadas. Son vimentina y queratina negativas.

Nuestros resultados en los cultivos primarios altamente purificados de CS, FE o CP son un paso muy importante y esencial para la aplicación a corto plazo en prótesis nerviosas, pues en el caso de no tener disponibilidad de estas prótesis, pueden ser construidas en corto tiempo para su utilización a partir de cultivos primarios.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Marcela Camacho por su asesoría crítica del proyecto de investigación y la donación de macrófagos de la línea J774A.1. Al laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, por su apoyo para poder realizar este trabajo. A la Fundación para la Promoción de la Investigación y Tecnología del Banco de la República de Colombia (Proyecto 2199) y a la División de Investigación de la sede Bogotá, Universidad Nacional de Colombia por la financiación de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

ALBERT B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER. Molecular Biology of the Cell 4th. Edition. New York: Garland Publishing, Inc; 2002. p. 1065-1126.

ANSSELIN AD, CORBEIL SD, DAVEY DF. Successfully culturing Schwann cells from adult peripheral nerve. Acta Med Aust. 1998;30:15-19.

ASKANAS V, ENGEL WK, DALAKAS MC, LAWRENCE JV, CARTER LC. Human Schwann cells in tissue culture. Arch Neurol. 1980;37:329-337.

BERNAL E, LEAL L, ROJAS D, REVELO N, SPINEL C. Primary cultures of the Schwann cells are not homologue between the dorsal root ganglia and the sciatic nerve.

Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2007. p. 323. <http://www.selectscience.com/commNWDetails.aspx?mailID=1227>

BUNGE MB, WILLIAMS AK, WOOD PM, UITTO J, JEFFREY JJ. Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures, with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J Cell Biol.* 1980;84:184-202.

BUNGE MB, WILLIAMS AK, WOOD PM. Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol.* 1982;92:449-460.

BUNGE MB, WORD PM, TYNAN LB, BATES ML, SANES JR. Perineurium originates from fibroblasts: demonstration *in vitro* with a retroviral marker. *Science.* 1989;243:229-231.

BUNGE R. The role of the Schwann cell in trophy support and regeneration. *Rev J Neurol.* 1994;242:S19-21.

CALDERÓN-MARTÍNEZ D, GARAVITO Z, SPINEL C Y HURTADO H. Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *J Neurosci Methods.* 2002;114:1-8.

CAMPBELL DG, GAGNON J, REID KB, WILLIAMS AF. Rat brain Thy-1 glycoprotein. The amino acid sequence, disulphide bonds and an unusual hydrophobic region. *Biochem J.* 1981;195(1):15-30.

CHANG HC, SEKI T, MORIUCHI T, SILVER J. Isolation and characterization of mouse Thy-1 genomic clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(11):3819-23.

CHATTERJEE R. Cell Biology: Cases of mistaken identity. *Science.* 2007;315:928-931.

CHI HA, HORIE H, HIKAWA N, TAKENAKA T. Isolation and age-related characterization of mouse Schwann cells from dorsal root ganglion explants in type I collagen gels. *J Neurosci Res.* 1993;35:183-187.

CROFT AP, PRZYBORSKI SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells. *Exp Neurol.* 2009;216:329-341.

DE MEYZÔ P, HALLEZ S, GU JL, MERCHEZ M, ECONOMIDIS I, *et al.* Aberrant expression of HLD-DR determinants on human thyroid cells treated with phytohemagglutinin and γ -interferon and on human melanoma cells. *Ann NY Acad Sci.* 1986;475:359-360

DENEJF JF, BJÖRKMAN U, EKHOLM R. Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles. *J Ultrastruct Res.* 1980;71:185-202

DICK P. Peripheral neuropathy. 3th Edit. Londres: W.B. Saunders Company: 1993.

DUBOVÝ P. Schwann cells and endoneurial extracellular matrix molecules as potential cues for sorting of regenerated axons: A review. *Anat Sci Int.* 2004;79(4):198-208.

ELSDALE T, BARD J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.* 1972;54:626-637.

EVANS GRD, BRANDT K, KATZ S, CHAUVIN P, OTTO L, *et al.*, Bioactive poly(l-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Cell.* 2002;23(3):481-484.

FU SY, GORDON T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14:67-116.

GALKO MJ, TESSIER-LAVIGNE M. Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science.* 2000;289(5483):1365-1367.

GARAVITO Z, MARTINEZ C, CALDERÓN D, RAHIRANT, CALDAS ML, *et al.* Obtención, cultivo y caracterización de células de Schwann: un modelo de terapia celular. *Latreia*. 2000a;13:95.

GARAVITO Z, MARTÍNEZ C, HURTADO H. Proliferación y expresión de marcadores por células de Schwann de rata adulta en cultivo. *Rev Colomb Biotecnol*. 2001;40-49.

GARAVITO ZV, SUTACHÁN JJ, MUÑETÓN VC, HURTADO H. S-100 protein: a suitable marker for adult mouse Schwann cells cultured *in vitro*? *In vitro Cell Develop Biol*. 2000b;36:281-283.

GUÉNARD V, AEBISCHER P, BUNGE RP. The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration is reversed by Schwann cells. *Exp Neurol*. 1994;126(1)b:44-60.

GIOVANNINI M, ROBANUS-MAANDAG E, NIWA-KAWAKITA M, VAN DER VALK M, WOODRUFF JM, *et al.* Schwann cell hyperplasia and tumors in transgenic mice expressing a naturally occurring mutant NF2 protein. *Genes Dev*. 1999;13(8):978-986.

HERRERA M, ONDO A, SPINELC. Estudio morfológico del cultivo a largo plazo de folículos aislados y cerrados de tiroides de cerdo. *Acta biol Colomb*. 2008;13(3):49-60.

HILL CE, MOON LDF, WOOD PM, BUNGE MB. Labeled Schwann cell transplantation: cell loss, host schwann cell replacement, and strategies to enhance survival. *Glia*. 2006;53:338-343.

HILLMANN G, GEBERT A, GEURTESSEN W. Matriz expresión and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. *J Cell Sci*. 1999;112:2823-2832.

HOOD B, LEVENE HB, LEVI AD. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurg Focus*. 2009;26(2):1-9.

JAAKKOLA S, PELTONEN J, UITTO JJ. Perineurial cells coexpress genes encoding interstitial collagens and basement membrane zone components. *J Cell Biol*. 1989;108:1157-1163.

JENQ CB, JENQ LL, COGGESHALL RE. Nerve regeneration changes with filters of different pore size. *Exp Neurol*. 1987;97:662-671.

JOSEPH NM, MUKOUYAMA YS, MOSHER JT, JAEGLE M, CRONE SA, *et al.* Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development*. 2004;131(22):5599-5612.

KANDA T, NUMATA Y, Y MIZUSAWA H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg*. 2004;75:765-769.

KARLSSON FA, WESTERMARK K, WESTWERMARK B. Functional properties of porcine thyroid follicles in suspension. *Mol Cell Endocrinol*. 1982;28:99-112.

KIM DH, CONNOLLY SE, KLINE DG, VOORHIES RM, SMITH A, *et al.*, Labeled Schwann cell transplants *versus* sural nerve grafts in nerve repair. *J Neurosurg*. 1994;80:254-260.

KNOOPS B, HURTADO H, van den BOSCH DE AGUILAR P. 1990. Rat sciatic nerve regeneration within an acrylic semipermeable tube and comparison with silicon impermeable material. *J Neuropathol Exp Neur*. 1990;49:438-448.

LABRADOR RO, BUTÍ M, NAVARRO X. Influence collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol*. 1998;149:243-252.

LAGO N, CASAS C, MUIR EM, ROGERS J, NAVARRO X. Effects of Schwann cell transplants in an experimental nerve amputee model. *Restor Neurol Neuros.* 2009;27:67-78.

LEAL L, PERDOMO S, SPINEL C. Aislamiento de fibroblastos endoneurales. *Acta biol Colomb.* 2004;9(2):57-65.

LEVI ADO, EVANS PJ, MACKINNON SE, BUNGE RP. Cold storage of peripheral nerves: an *in vitro* assay of cell viability and function. *Glia.* 1994a;10:121-131.

LEVI ADO, GUÉNARD V, AEBISCHER, BUNGE RP. The functional characteristics of schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J Neurosci.* 1994b;14(3):1309-1319.

LEVI ADO. Characterization of the technique involved in isolating Schwann-cells from adult human peripheral-nerve. *J Neurosci Methods.* 1996;68:21-26.

LEVITAN PAH, ROBINSON PJ, RAPOPORT SI. Peripheral nerve as an osmometer: role of the perineurium in frog sciatic nerve. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1983;244(1):C75-C81.

LUNA LG: Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3th Edition. New York: McGraw-Hill Co.; 1960. p. 1-46.

MINDAN FJP, GUIU XM, de ÀLAVA E, de RAMÓN Y CAJAL S. Neoplasias En: Mindan P, Javier F Editores. *Anatomía patológica.* Madrid: Harcourt; 1996. p. 396-397.

MIRSKY R, JESSEN RK. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.* 1999a;22:402-410.

MIRSKY R, JESSEN RK. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol.* 1999b;9:293-311.

MORRISSEY TK, KLEITMAN N, BUNGE RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci.* 1991;11:2433-2442.

MUÑETÓN V, GARAVITO Z, HURTADO H. Cultivo de células de Schwann. Un modelo del microambiente del sistema nervioso. *Biomedica.* 1998;18:45-54.

MUONA P, SOLLBERG S, PELTONEN J, UITTO J. Glucose transporters of rat peripheral nerve. Differential expression of GLUT1 gene by Schwann cells and perineural cells in vivo and *in vitro*. *Diabetes.* 1992;41(12):1587-159.

NADRI S, SOLEIMANI M. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. *in vitro Cell Dev Biol Anim.* 2007;43:276-282.

NAGAOKA T, OYAMADA M, OKAJIMA S, TAKAMATSU T. Differential expression of gap junction proteins connexin 26, 32 y 43 in normal and crush-injured rat sciatic nerves: close relationship between connexin 43 and occludin in the perineurium. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(7):937-948.

NAGASE H, WOESSNER JF. Matrix Metalloproteinases. Minireview. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491-21494.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington: National Academy Press; 1996.

PARMANTIER E, LYNN B, LAWSON D, TURMAINE M, NAMINI SS, CHAKRABARTI L, *et al.*, Schwann cell-derived desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron.* 1999;23(4):713-724.

PEI Y, SHERRY DM, McDERMOTT AM. Thy-1 distinguishes human corneal fibroblasts and myofibroblasts from keratocytes. *Exp Eye Res.* 2004;79(5):705-12.

PELTONEN J, JAAKKOLA S, VIRTANEN I, PELLINIEMI L. Perineurial cells in culture: an immunocytochemical and electron microscopic study. *Lab Invest.* 1987;57(5):480-488.

PERDOMO S, CAMARGO LH. Análisis morfológico de la regeneración de nervio ciático de rata adulta crónicamente denervado implantado con células de Schwann autólogas [Tesis de pregrado]. Bogotá: Univ. Distrital Francisco José de Caldas: 2001.

PERDOMO S, SPINEL C. La célula de Schwann. *Acta biol Colomb.* 2004;9(2):25-34.

PETERS A, PALAY S, WEBSTER H. The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. 3th edition. New York: Oxford University Press: 1991.

POPOVIC M, BRESIANAC M, SKETELJ J. Regenerating axons enhance differentiation of perineurial-like cells involved in minifascicle formation in the injured peripheral nerve. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(6):590-597.

POPOVIC M, BRESJANAC M, SKETELJ J. Role of axon-deprived Schwann cells in perineurial regeneration in the rat sciatic nerve. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26:221-231.

PUMMI KP, HEAPE AM, GRÉNMAN RA, PELTONEN JTK, PELTONEN SA. Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(8):1037-1046.

RAISMAN G. Olfactory ensheathing cells—another miracle cure for spinal cord injury. *Nat Cell Biol.* 2004;2:369-374.

RAMBOTTI MG, SPRECA A, LEONCINI P, ESTENOZ M, COSTANTINO-CECCARINI E, GIAMBANCO I, *et al.*, Detection of S-100b Protein in Triton Cytoskeletons: An immunocytochemical study on cultured Schwann cells. *J Histochem Cytochem.* 1990;38:1583-1589.

RODRÍGUEZ A, ROJAS MA, MONTENEGRO MA, REGADERA J. Expresión de filamentos intermedios durante el desarrollo embrionario de cerdo (*Sus scrofa*) y bovino (*Bos taurus*). *Rev chil anat.* 2000;18(2):237-244.

RODRÍGUEZ FJ, VERDÚ E, CEBALLOS D, NAVARRO X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2000;16:571-584.

ROSENBAUM T, BOISSY YL, KOMBRINCK K, BRANNAN CL, JENKINS NA, COPELAND NG, *et al.*, Neurofibromin-deficient fibroblasts fail to form perineurium *in vitro*. *Development.* 1995;21:3583-3592.

SCHMALENBERG KE, UHRICH KE. Micropatterned polymer substrates control alignment of proliferating Schwann cells to direct neuronal regeneration. *Biomaterials.* 2005;26:1423-1430.

SCOTT KA, EDWARD JW, KARRAN EH. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FEBS Lett.* 1998;441:137-140.

SHANTHAVEERAPPA TR, BOURNE GH. Perineurial epithelium: A new concept of its role in the integrity of the peripheral nervous system. *Science.* 1966;154(3755):1464-1467.

SIIRONEN J, SANDBERG M, VUORINEN V, ROYTTA M. Expression of type I and III collagens and fibronectin after transection of rat sciatic nerve. *Reinnervation*

compared with denervation. *Lab Invest.* 1992;67(1):80-7.

SMITH CE, ATCHABAHIAN A, MACKINNON SE, HUNTER DA. Development of the blood-nerve barrier in neonatal rats. *Microsurgery.* 2001;21:290-297.

SPIKER M, ASANO K, YANNAS IV, SPECTOR M. Contraction of collagen-glycosaminoglycan matrices by peripheral nerve cells *in vitro*. *Biomaterials.* 2001;22:105-1093.

SPINEL C, COLIN I, van den HOVE M-F, DENEJ J-F. Correlated morphological and functional study of isolated rat thyroid follicles in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 1990;71:141-153.

SPRECA A, RAMBOTTI MG, RENDE M, SACCARDIC, AISAMC, GIAMBANCO I, *et al.*, Immunocytochemical localization of S-100 β protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *J Histochem Cytochem.* 1989;37:441-446.

STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.

SUTACHÁN JJ, DUQUE E, HURTADO H. Estudio de la regeneración del nervio periférico a través de cámaras de silicona permeables con poros de 10 y 60 μ m. *Biomedica.* 1999;19:207-213.

TAKAMI T, OUDEGAM, BATES ML, WOOD PM, KLEITMAN N, BUNGE MB. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J Neurosci.* 2002;22(15):6670-6681.

TODD BA, INMAN C, SEDGWICK EM, ABBOTT NJ. Ionic permeability of the frog sciatic nerve perineurium: Potassium and lanthanum penetration using electrophysiology and microscopic techniques. *J Neurosci.* 2000;29(8):551-567.

Van den BERG LH, BAR PR, SODAAR P, MOLLEE I, WOKKE JH, LOGTENBERG T. Selective expansion and long term culture of human Schwann cells from sural nerve biopsies. *Ann Neurol.* 1995;38:674-678.

VICTORIA DM, CUERVO L, SPINEL CM.1 Morphological analysis of acini closed in the long term of submandibular gland mouse. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2007. p. 320. <http://www.selectscience.com/commNWDDetails.aspx?mailID=1227>

VLEGGEERT-LANKAMP CL, PEGO AP, LAKKE EA, DEENEN M, MARANI E, THOMEER RT. Adhesion and Proliferation of Human Schwann Cells on Adhesive Coatings. *Biomaterials.* 2004;25:2741-2751.

WALBEEHM ET, AFOKE A, WIT T, COLMAN F, HOVIUS SER, BROWN RA. Mechanical functioning of peripheral nerves: Linkage with the "mushrooming" effect. *Cell Tissue Res.* 2004;316:115-121.

WALKER JC, BRENNER MJ, MACKINNON SE, WINOGRAD JM, HUNTER DA. Effect of perineurial window size on nerve regeneration, blood-nerve barrier integrity, and functional recovery. *J Neurotraum.* 2004;21(2):217-227.

WILLIAMS LR Y VARON S. Modification of fibrin matrix formation *in situ* enhances nerve regeneration in silicone chambers. *J Comp Neurol.* 1985;231:209-220.

WONG WR, KOSSODO S, KOICHEVAR IE. Influence of cytokines on matrix metalloproteinases produced by fibroblasts cultured in monolayer and collagen gels. *J Formos Med Assoc.* 2001;100:377-382.

WOOD PM, BUNGE RP. Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Nature*. 1975;256:662-664.

XU XM, GUÉNARD V, KLEITMAN N, BUNGE MB. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Pathol*. 1995;351:145-160.

YANG J, GUZMAN R, RICHARDS J, NANDI S. Primary culture of mouse mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *in vitro*. 1980;76:502-506.

YANNAS IV, HILL BJ. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials*. 2004;25:1593-1600.

ZHANG QL, LIN PX, CHANG Y, WEBSTER HD. Effects of nerve segment supernatants on cultured Schwann cell proliferation and laminin production. *J Neurosci Res*. 1994;37:612-622.