

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS ENDONEURALES

Endoneural fibroblasts isolation and culture

LESLIE LEAL¹, SANDRA PERDOMO^{2,3}, CLARA SPINEL^{1,2}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

²Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física,
Bogotá, Colombia.

³Universidad de la Sabana, Bogotá, Colombia.

Presentado en abril 20 de 2004, aceptado en agosto 26 de 2004

RESUMEN

Los fibroblastos son tejido-específicos, normalmente degradan y sintetizan constantemente los diferentes elementos de la matriz extracelular (MEC), pero también remodelan los tejidos en reparación. Los fibroblastos dérmicos son los más estudiados *in vitro* e *in vivo* y se emplean para regenerar la MEC dérmica que sirve de apoyo para la regeneración de la epidermis. La confluencia de los fibroblastos dérmicos o periodontales se hace entre los ocho y diez días de cultivo. En la regeneración de nervios periféricos lesionados, las células de Schwann secretan factores de crecimiento neurotróficos y neurotróficos y algunos elementos de la MEC necesarios para la regeneración, motivo por el cual son las más estudiadas y empleadas. Hasta el momento los fibroblastos endoneurales (FE) no se han tenido en cuenta como elemento importante en la regeneración nerviosa porque en ocasiones forman fibromas que impiden la regeneración del nervio. Pero hay indicios, que pueden jugar un papel importante adicional al remodelar la MEC, secretando metaloproteínas que además convierten el preNGF (*Nerve Growth Factor*) secretado por las células de Schwann en NGF activo que promueve la regeneración de las neuritas. El objetivo de este trabajo fue aislar y lograr el cultivo de FE purificados de nervios ciáticos de ratón adulto. Se desarrollaron diferentes métodos de disección y digestión para obtener los cultivos primarios de FE puros y estudiarlos como se ha hecho con células de Schwann. Se logró aislar selectivamente FE, alcanzado la confluencia entre el cuarto y el quinto día de cultivo primario en monocapa. La obtención de una población de FE permitirá estudios en cultivos tridimensionales y en prótesis, para desarrollar y determinar nuevas alternativas en la regeneración de nervios periféricos.

Palabras clave: nervio ciático, fibroblastos endoneurales, cultivo en monocapa.

ABSTRACT

Fibroblasts which are tissue-specific, constantly degrade and synthesize the different elements of the extra-cellular matrix (ECM), while at the same time remodel tissues that are being repaired. Dermal fibroblasts are well studied both *in vitro* and *in vivo*, and are

used to regenerate dermal EMC which in turn supports the regeneration of the epidermis. Confluence of dermal or periodontal fibroblasts takes place between 8 and 10 days of culture. In the process of regeneration of damaged peripheral nerves, Schwann's cells secrete neurotrophic and neurotropic growth factors and some of the EMC elements needed for regeneration to take place, which makes them the most studied and used cells in culture. So far, endoneural fibroblasts (EF) have not been considered as important elements in nerve regeneration, mainly because they may occasionally form fibromes that hinder regeneration. But there is evidence that they may play a role in the remodeling of the EMC, through the secretion of metalloproteins that modify the pre-Nerve Growth Factor (preNGF) secreted by Schwann's cells into active NGF, which promotes neurites regeneration. The aim of this study was to isolate EF from sciatic nerves taken from mature rats, and to obtain them in purified culture. A number of methods of dissection and digestion were developed to obtain primary pure EF cultures as well as to study them in the way Schwann's cells have been studied. Selective isolation of EF was accomplished, reaching confluence between the fourth and the fifth day in monolayer primary culture. Producing a population of EF will make it possible to carry out studies in tridimensional culture and in prosthesis in order to define and develop new alternatives for the regeneration of peripheral nerves.

Key words: Sciatic nerve, endoneural fibroblasts, monolayer culture.

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso periférico (SNP) comprende los ganglios, los nervios y las terminaciones nerviosas situados fuera del sistema nervioso central (SNC) que es conformado por el encéfalo y la médula espinal. La función básica del SNP es mantener a todos los otros tejidos del cuerpo en comunicación con el SNC. De esta manera todas las funciones del organismo se integran, siendo controlada la actividad del individuo como un todo. Los nervios están constituidos por fibras nerviosas que son los axones recubiertos por las células de Schwann (CS) o glia del SNP. A cada fibra nerviosa la rodea una membrana basal que a su vez está cubierta de tejido conectivo que recibe el nombre de endoneuro. Las células que recubren varias fibras forman una capa alrededor de los fascículos nerviosos llamada perineuro. El tejido conectivo que reúne todos los fascículos se llama epineuro (Bloom y Fawcett, 1975; Arvidson, 1979; Sabotta y Hammersen, 1980; Terzis y Smith, 1990).

En vertebrados, el sistema nervioso se encarga de integrar la función de los componentes del organismo y de coordinar y controlar las interacciones de éste con el medio ambiente, por lo que resulta muy importante proteger dicho sistema, con este fin, durante la evolución se han desarrollado algunas estrategias que previenen las lesiones del sistema nervioso central (SNC) y otras, como la plasticidad neural que permiten la reparación espontánea de las lesiones del sistema nervioso periférico (SNP). La presencia de lámina o membrana basal con sus proteínas neuritogénicas alrededor de las células de Schwann y la interacción de los brotes axonales con las células de Schwann de la mielina periférica, estimulan la regeneración de los axones dañados (Nieto-Sampedro y

Verdú, 1998). Los fibroblastos son las células del tejido conectivo que secretan la mayoría de los componentes de la matriz extracelular, como: proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibras de adhesión y fibras de soporte, principalmente colágeno fibrilar. Los fibroblastos son células muy versátiles que tienen la capacidad de diferenciarse en otras células del tejido conectivo en respuesta a un daño o a estímulos adecuados. Existen evidencias de que los fibroblastos son células tejido-específicas, es decir, que presentan diferencias dependiendo del tejido al que pertenecen (Alberts *et al.*, 2002). Los fibroblastos corresponden al mayor elemento celular no neuronal del endoneuro, son muy alargados y delgados rodeados por el colágeno endoneural que producen (Olsson, 1998).

Hay una controversia en la literatura sobre el papel de los fibroblastos en la regeneración de los nervios. Los fibroblastos tendrían una influencia negativa cuando se forman neuromas que impiden la regeneración o secretan el peptidoglicano NG3 que forma la cicatriz del nervio e inhibe la proliferación de los axones. Estudios de regeneración en cámaras con poros han proporcionado evidencia que los fibroblastos parcialmente son responsables de la alteración topográfica del nervio en regeneración (Jenq y Coggeshall, 1985; Jenq y Coggeshall, 1987; Jenq *et al.*, 1987; Hurtado *et al.*, 1987 y Hurtado, 1997) y, como secretan colágeno y fibronectina que son el sustrato y la guía del crecimiento axonal, liberan factores de crecimiento que estimulan las etapas iniciales de la regeneración. Los fibroblastos también secretan colagenasa y otras metaloproteasas (Langer y Vacanti, 1993; Watchmaker y Mackinnon, 1997; Heat y Rutkowski, 1998) que permiten la renovación y reorganización constante del tejido conectivo normal en el adulto (Wong *et al.*, 2001). La presencia de fibroblastos podría ser importante durante el proceso de regeneración al madurar el preNGF en NGF. Adicionalmente, se conoce que estas células participan en los procesos de cicatrización para la recuperación de los tejidos lesionados de acuerdo a los factores que los estimulan. Se ha encontrado que existe una cooperación de fibras de adhesión y fibras de soporte de la matriz extracelular durante el crecimiento axonal *in vitro* al variar concentraciones y combinaciones de estos elementos fibrosos (Tong *et al.*, 1997).

El endoneuro tiene una gran cantidad de colágeno fibrilar, que forma el esqueleto principal para las fibras nerviosas y los fascículos del nervio, confiriéndole al nervio resistencia a las fuerzas de compresión y estiramiento. Se ha demostrado *in vitro* que el colágeno es necesario para la formación de mielina (Liu, 1992; Olsson, 1998). Las fibras de colágeno intrafascicular son más delgadas que las que se encuentran en el epineuro y se orientan principalmente a lo largo del nervio (Olsson, 1998). Las fibras de colágeno tipo I y III del epineuro y endoneuro se localizan en la misma región espacial, pero, en el endoneuro es más abundante el colágeno tipo I (Olsson, 1998). El propósito de cualquier técnica de reparación de nervio es reestablecer la continuidad del nervio incluyendo todos sus elementos, con el fin de lograr una óptima reinervación del tejido blanco (Langer y Vacanti, 1993; Nieto-Sampedro y Verdú, 1998). Para esto es importante estudiar los elementos celulares que se encuentran implicados en la regeneración nerviosa, por eso proponemos aislar y caracterizar los fibroblastos endoneurales (FE) para ser utilizados en estudios futuros, similares a los realizados con las células de Schwann.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los fibroblastos endoneurales (FE) se aislaron a partir de nervio ciático de ratones ICR (20 a 30 g) provenientes del Bioterio de Experimentación y Producción del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. Se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los nervios ciáticos en condiciones de asepsia y se colocaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma, R-4130) con 50 mg/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomycin (Sigma, P-3539) y 0,25 mg/ml de anfotericina (Sigma, 9528). Se hicieron cultivos por explantes de nervios de aproximadamente 3 mm de largo sin epineuro, los cuales fueron colocados en frascos plásticos de cultivo de 25 cm². Los cultivos se mantuvieron con 5 ml por caja de medio suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, 26140079), en una atmósfera de CO₂ (5%) a 37° C y 560 mm de Hg; el medio se cambió cada tercer día hasta obtener confluencia (Hurtado, 1991; Muñetón *et al.*, 1998) y, como se ha descrito para las células de Schwann (Garavito *et al.*, 2001), con una solución de tripsina 0,25% (Sigma, T-4799). La viabilidad de las células en suspensión se determinó en cámara Neubauer con azul trypan (0,5%); (Sigma, T-8154). El subcultivo se inicia con 100.000 células/ml hasta lograr de nuevo confluencia. Este protocolo se repitió hasta realizar tres subcultivos. Los fibroblastos fueron identificados por su morfología. En otro protocolo que se realizó, añadió 20% de SFB en el cultivo primario por explantes y en los subcultivos.

Paralelamente, se realizó el cultivo de células de Schwann (CS) según los protocolos ya establecidos en el laboratorio por explante de nervio ciático y de ganglio de la raíz dorsal (GRD). Además, se hizo disociación del nervio y de los GRD, primero enzimática (750 U/ml de colagenasa, Sigma, C-6885), seguida de una mecánica con ayuda de pipetas. El cultivo se hizo en frascos plásticos de cultivo de 25 cm² recubiertas con 0,1 mg/ml de colágeno tipo I extraído de colas de rata. Los cultivos se mantuvieron con 5 ml de medio por caja suplementado con SFB (10%), en una atmósfera de CO₂ (5%) a 37°C y 560 mmHg de presión; el medio se cambió cada tercer día hasta obtener confluencia (Hurtado, 1991; Muñetón *et al.*, 1998; Garavito *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002). En los subcultivos se logró de un 75 a 80% de CS en monocapa (Garavito *et al.*, 2001; Perdomo y Camargo, 2001; Calderón *et al.*, 2002). Estos cultivos de CS fueron el punto de partida para realizar el cultivo de FE y los empleamos como patrones con los cuales comparamos nuestro cultivo. Se desarrolló otro método de cultivo primario. Al nervio ciático se le eliminó el epineuro y el perineuro. El parénquima sin estos tejidos conectivos fue tratado con 400 U/ml de colagenasa (Sigma, C-6885) en medio de cultivo sin SBF durante 15 minutos a 37° C. La viabilidad de las células en suspensión se determinó tanto para el subcultivo de los explantes como para los subcultivos de células aisladas. El medio se cambió a las primeras 24 horas de cultivo y posteriormente cada tercer día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cultivos por explantes con 10% SFB, la migración de las primeras células sobre el soporte de la caja de cultivo se observa a partir del cuarto o quinto día de cultivo

y la proliferación celular es muy lenta. La confluencia en el cultivo primario se logra a los 20 días, donde los FE son los que predominan pero se observan células de Schwann (CS) contaminantes en nuestro caso. Por esta técnica solo se obtuvieron cultivos puros de fibroblastos en el cuarto subcultivo, a los 35 días de iniciado el cultivo primario.

Antes de iniciar estos protocolos de cultivos de FE, sabíamos que los fibroblastos eran las células contaminantes (Morrison *et al.*, 1991) en todos los cultivos de CS, ya sea a partir de ganglio de la raíz dorsal, de nervio ciático de neonatos o de nervio ciático de adulto (Garavito *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002). Todos estos cultivos fueron enriquecidos con factores mitogénicos para favorecer el crecimiento de CS. En nuestro grupo se ha establecido que los fibroblastos son las células contaminantes de los cultivos de CS porque proliferan más rápido, por lo tanto no se añadieron los factores mitogénicos en los cultivos por explantes, lo que favoreció en los subcultivos la proliferación de los FE y así aumentó la población de FE disminuyendo entre un 70 a un 80% el número de CS en los cultivos primarios que llegan a confluencia entre 18 a 22 días. El aumento de la concentración del SFB en los cultivos favorece la proliferación de los fibroblastos (Paul, 1975), se comprobó una disminución aún más notoria de CS y la proliferación de FE con un aumento del SFB a 20% logrando una confluencia de FE a los 12 días de cultivo primario (Fig. 1). A partir de estos cultivos primarios se logra una purificación de FE entre el quinto al séptimo subcultivo.

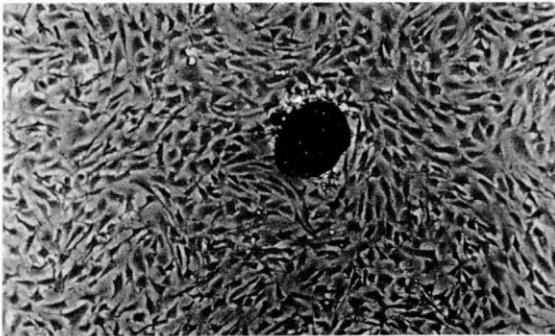


Figura 1. Cultivo de fibroblastos endoneurales (FE) por explante. Confluencia a los 12 días del cultivo primario de FE a partir del explante (estructura redondeada central oscura) de nervio ciático de ratón sin epi y perineuro con 20% de suero bovino fetal, (100X).

El objetivo primordial es poder asegurar el origen endoneural de los fibroblastos y tratar de purificar la población de FE evitando la presencia de CS desde el inicio del cultivo primario y para evitar los fibroblastos epineurales u otro tipo de fibroblasto de tejidos conectivos de las vecindades del nervio, se realizaron algunos cambios a la metodología descrita. Se hizo una disección más fina, eliminando el epineuro y el perineuro del nervio ciático antes del cultivo. El nervio limpio se puso en cultivo como pequeños fragmentos en la caja de cultivo. Se observó una migración más rápida de los fibroblastos que se daba al segundo día de cultivo y una proliferación más rápida, esperando con estos resultados que los FE colonizaran la superficie de cultivo de ma-

nera que las CS no pudieran migrar ni proliferar. Efectivamente, se logró un cultivo de FE con menos CS en el cultivo primario con SBF (20%). La población de FE purificados se obtenía en el tercer pasaje de cultivo secundario. Para acelerar la proliferación y aumentar el número de fibroblastos en los cultivos primarios y los secundarios, se aumentó el suplemento de SBF al 20%, encontrando una disminución en el tiempo de confluencia aproximadamente a la mitad, es decir 10 a 12 días de cultivo. Además, una reducción casi del 95% de células contaminantes comparado con los cultivos suplementados con 10% de SBF.

Los fibroblastos de los tejidos conectivos como la dermis, cuando se aíslan en suspensión y se ponen en cultivo, se adhieren más rápidamente y esto favorece la proliferación (Paul, 1975). Con el fin de disminuir aún más el tiempo de obtención de los FE, luego de eliminar epineuro y perineuro del nervio se disoció primero enzimática y luego mecánicamente de manera muy controlada. Con este método la cantidad de fibroblastos adheridos al soporte fue mucho mayor y su adhesión mucho más rápida que en la técnica por explantes, lo que dio como resultado una disminución en el tiempo de confluencia que se alcanzó a los cuatro o cinco días. La contaminación por otros tipos celulares en el cultivo se redujo, de manera que con uno o máximo dos subcultivos se logra una población purificada de FE (Fig. 2).

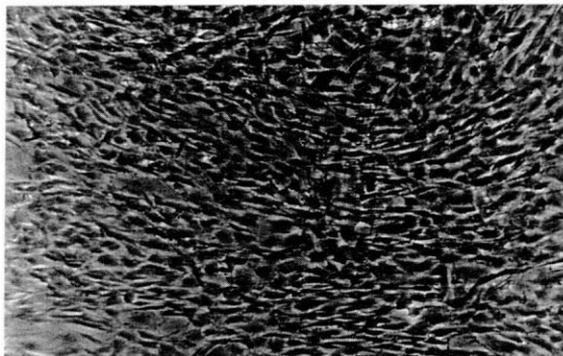


Figura 2. Siete días del segundo subcultivo de fibroblastos endoneurales obtenidos por disociaciones enzimática y mecánica del nervio ciático y 45 días de cultivo primario. Note que no hay presencia de células de Schwann. (200X).

La disminución en los tiempos de confluencia de los cultivos primarios al pasar de la técnica por explantes a la técnica por disociación, se debe a que en esta última las células no deben migrar a través del nervio para salir de su tejido y adherirse a la caja para proliferar, sino que fueron liberadas del tejido por la disociación que se hizo al parénquima nervioso. Estos fibroblastos se adhirieron en menos tiempo a la superficie de la caja de cultivo, alcanzando confluencia más rápido que los cultivos por explantes. La disminución del tiempo de confluencia prácticamente a la mitad empleando SBF al 20%, se puede deber a la similitud en componentes del SBF y de la sustancia amorfa del tejido conectivo, que es el medio en el que se encuentran los fibroblastos

in vivo (Bloom y Fawcett, 1975), favoreciendo de esa manera la proliferación y la supervivencia de estas células cuando están en cultivo (Hillmann *et al.*, 1999). Este efecto parece específico para los fibroblastos, pues no es observado en cultivos de otros tipos celulares como tirocitos o CS (Denef *et al.*, 1980; Spinel-Gómez *et al.*, 1990; Perdomo y Camargo, 2001). La eliminación de CS se vió favorecida porque no se colocó colágeno sobre la superficie de los cultivos ni factores mitogénicos. Se sabe que las CS necesitan este soporte para sobrevivir mejor que sobre el plástico y mantenerse *in vitro*, usualmente se cubren con colágeno las cajas para su cultivo, por lo tanto, aunque las CS logren adherirse al soporte es muy difícil que sobrevivan (Garavito *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2002). En los cultivos por explantes mantenidos con SBF al 10%, la contaminación de las CS al inicio de los cultivos es alta, puesto que primero migran los fibroblastos y proliferan, y algunos días después cuando la monocapa aumenta pero aún no se ha alcanzado confluencia, empiezan a migrar las células de Schwann y se establecen y proliferan entre la monocapa de fibroblastos y el colágeno que han sintetizado los fibroblastos. La contaminación se redujo al aumentar la concentración del 10 al 20% de SBF en los cultivos por explantes, porque se redujo el tiempo de confluencia de los FE y como el suero no tiene efecto sobre la proliferación de las CS, fue menor la cantidad de ellas que logró establecerse en estos cultivos. En cuanto a los cultivos por disociación, permanecían casi libres de contaminantes desde el cultivo primario, puesto que la disociación libera tanto fibroblastos como células de Schwann, pero estas últimas de no encontrar un ambiente adecuado para sobrevivir y mantenerse en cultivo, mueren, representando un grado de contaminación muy bajo al inicio del cultivo primario.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se pudo realizar gracias al apoyo financiero de la Oficina de Investigación (DIB, proyecto código No. 803648) y del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia; de la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República de Colombia, proyecto código No. 1239; del Centro Internacional de Física y del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Queremos agradecer a María Leonor Caldas, Ligia Lugo, Natalia Ruiz, Enrique Forero y Hernán Hurtado, quienes nos apoyaron a lo largo de la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J.D. WATSON. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th Edition. Garland Publishing Inc., Londres.
- ARVIDSON B. 1979. A Study of the Perineurial Diffusion Barrier of a Peripheral Ganglia. *Acta Neuropathol.* 46: 139-144.
- BLOOM W., D.W. FAWCET. 1975. A Textboock of Histology. 10th Edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia.
- DENEF J-F., U. BJÖRKMAN, R. EKHOLM. 1980. Structural and Functional Characteristics of Isolated Thyroid Follicles. *J. Ultrastruc. Res.* 71: 185-202.

- CALDERÓN-MARTÍNEZ D., Z. GARAVITO, C. SPINEL, H. HURTADO. 2002. Schwann Cell-Enriched Cultures from Adult Human Peripheral Nerve: A Technique Combining Short Enzymatic Dissociation and Treatment with Cytosine Arabinoside (Ara-C). *J. Neurosc. Meth.* 114: 1-8.
- GARAVITO Z., C. MARTÍNEZ, H. HURTADO. 2001. Proliferación y expresión de marcadores por células de Schwann de rata adulta en cultivo. *Biotechnología.* 2 (1): 40-48.
- HEAT C., G. RUTKOWSKI. 1998. The Development of Bioartificial Nerve Grafts for Peripheral Nerve Regeneration. *Tibtech.* 16: 163-168.
- HILLMANN G., A. GEBERT, W. GEURTESEN 1999. Matrix Expression and Proliferation of Primary Gingival Fibroblasts in a Three-Dimensional Cell Culture Model. *J. Cell. Sci.* 112: 2823-2832.
- HURTADO H. 1991. Efecto del líquido acumulado en una cámara de regeneración sobre la supervivencia y maduración *in vitro* de fibroblastos de nervio ciático de rata adulta. *Neurociencias en Colombia.* 1: 37-42
- _____. 1997. Efecto de la permeabilidad en la regeneración del nervio ciático entubado de rata. *Biomédica.* 17: 27-33.
- _____, B. KNOOPS, P. van den BOSCH DE AGUILAR. 1987. Rat Sciatic Nerve Regeneration in Semipermeable Artificial Tubes. *Exp. Neurol.* 97: 751-757.
- JENQ C. B., COGGESHALL R. E. 1985. Nerve Regeneration Through Holey Tubes. *Brain Res.* 361: 233-241.
- _____, R.E. COGGESHALL. 1987. Permeable Tubes Increase the Length of the Gap that Regenerating Axons Can Span. *Brain Res.* 408: 239-242.
- _____, L.L. JENQ, R.E. COGGESHALL. 1987. Nerve Regeneration Changes with Filters of Different Pore Size. *Exp. Neurol.* 97: 662-671.
- LANGER R., J.P. VACANTI. 1993. *Tissue Engineering.* Science. 206: 920-926.
- LIU H.M. 1992. The Rol of Extracellular Matrix in Peripheral Nerve Regeneration: A Wound Chamber Study. *Acta Neuropathol.* 83: 469-474.
- MORRISSON T.K., N. KLEITMAN, R.R. BUNGE 1991. Isolation and Functional Characterization of Schwann Cells Derived from Rat Adult Peripheral Nerve. *J. Neurosci.* 11: 2.433-2.442.
- MUÑETÓN V.C., Z.V. GARAVITO, H. HURTADO. 1998. Cultivo de células de Schwann, un modelo de microambiente del sistema nervioso. *Biomédica.* 18 (1): 45-54.
- NIETO-SAMPEDRO M., E. VERDÚ. 1998. Lesiones del sistema nervioso: Respuesta neuronal y reparación. En: *Manual de Neurociencias*, capítulo 37, (Delgado J.M., A. Ferrús, F. Mora y F.J. Rubia, Eds.), Editorial Síntesis, Madrid. 929-966.
- OLSSON Y. 1998. Microenvironment of the Peripheral Nervous System. *Experimental Basis and Clinical Implications.* Capítulo I.
[http://www.genpat.uu.se/persons/yo/Micro env/yoindex.html](http://www.genpat.uu.se/persons/yo/Micro%20env/yoindex.html)
- PAUL J. 1975. *Cell and Tissue Culture.* Churchill Livingtone, New York.
- PERDOMO S., L.H. CAMARGO. 2001. Análisis morfológico de la regeneración de nervio ciático de rata adulta crónicamente denervado implantado con células de Schwann autólogas. Tesis de pregrado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia.

- SABOTTA F., H. HAMMERSEN 1980. Histology. 2th Edition. Uraban and Schwarzenverg, Baltimore.
- SPINEL-GÓMEZ C., I. COLIN, M-F. van den HOVE, J-F. DENEFF. 1990. Correlated Morphological and Functional Study of Isolated Rat Thyroid Follicles in Culture. Mol. Cell. Endocrinol. 71: 141-153.
- TERZIS J.K., K.L. SMITH. 1990. The Peripheral Nerve. Structure, Function and Reconstruction. Raven Press. Virginia.
- TONG D.D., J.P. GOLDING, M. EDBLADH, M. KROON, P.E.R. ERKSTROM, A. EDSTROM. 1997. Effects of Extracellular Matrix Components on Axonal Outgrowth from Peripheral Nerves of Adult Animals *in vitro*. Exp. Neurol. 146: 81-90.
- WATCHMAKER G.P., S.E. MACKINONN. 1997. Advances in Peripheral Nerve Repair. Clin. Plast. Surg. 24: 63-73.
- WONG W.R., S. KOSSODO, I.E. KOCHEVAR. 2001. Influence of Cytokines on Matrix Metalloproteinases Produced by Fibroblasts Cultured in Monolayer and Collagen Gels. J. Formos. Med. Assoc. 100: 377-382.