

Proliferación y expresión de marcadores por células de Schwann de rata adulta en cultivo

Schwann cells proliferation and marker expression on adult rat in culture

Zayra Garavito*; Constanza Martínez**; Hernán Hurtado***

RESUMEN

En este trabajo se evalúan diferentes técnicas para obtención y cultivo de células de Schwann provenientes del nervio periférico de rata adulta, de las cuales la que evidencia mejor respuesta es la que combina una degeneración walleriana durante 14 días *in vitro*, seguida de una disociación enzimática.

La adición de mitógenos como la forskolina y extracto de pituitaria no muestra un efecto sobre estas células. Los niveles de enriquecimiento en células de Schwann, definidos de acuerdo con patrones morfológicos y de expresión de marcadores tales como la proteína S-100 o la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), son buenos (del orden de 80-88%) hasta los ocho días de cultivo. La detección de bromodeoxiouridina (BrdU) incorporada por células en fase S del ciclo celular, demuestra que en términos generales la tasa de incorporación de BrdU de las células giales del sistema nervioso periférico no cambia.

Palabras clave: nervio periférico, regeneración, célula de Schwann, cultivo celular, ingeniería de tejidos, mitógenos.

SUMMARY

This study evaluated some techniques for culture and growth of Schwann Cells from adult rats peripheral nerves. The best of these methods is a combination of *in vitro*

Bióloga, Universidad Nacional de Colombia, Laboratorio de Neurociencias. Instituto Nacional de Salud.
Odontóloga, Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Neurociencias. Instituto Nacional de Salud. Biólogo, Universidad de los Andes. PhD. Coordinador de Investigación. Laboratorio de Neurociencias. Instituto Nacional de Salud INS Av Eldorado Carrera 50. Subdirección de Investigación. Laboratorio de Neurociencias. Bogotá.

Wallerian degeneration during 14 days, followed by an enzymatic dissociation with collagenase and dispase. Mitogens like forskolin and pituitary extract do not have any effects on these cells. Enrichment of the culture (measure by morphological and immunocytochemical criteria) was about 80-88% until 8 days in culture. Stable Level of BrdU incorporation suggested that the population of cells entering S phase does not change.

Key words: peripheral nerve, regeneration, Schwann cell, cell culture, tissue engineering, mitogens.

INTRODUCCIÓN

Como todos los sistemas biológicos, el nervio periférico es susceptible de sufrir lesiones. Estas van desde las causadas por agentes patógenos, problemas metabólicos e inmunológicos, hasta las originadas por traumas. La reparación y la recuperación funcional de una lesión de este tipo depende de múltiples factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la neurona (Fu y Gordon, 1997). El primer factor intrínseco es la supervivencia de la neurona a la lesión, que depende del tipo de neurona, de la edad del individuo y del grado y proximidad de la lesión al cuerpo neuronal (Lowrie *et al.*, 1994, Fu y Gordon, 1997).

Las neuronas que sobreviven a la lesión pasan de un "modo de transmisión" a un "modo de crecimiento". Este cambio se ve reflejado tanto morfológica como bioquímicamente. En el primer caso los cambios más notorios son el aumento en el soma de la neurona y del nucléolo, la excentricidad nuclear y la desaparición de los cuerpos de Nissl; estas modificaciones morfológicas son conocidas como reacción cromatolítica. En el segundo caso se observa la sobreexpresión de proteínas como la proteína asociada al crecimiento (GAP-43), proteínas de citoesqueleto como actina y tubulina, neuropéptidos como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la galanina, el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y la sustancia P, y la re-

gulación negativa de proteínas tales como neurofilamento, la enzima colina acetil transferasa y el neuropéptido, entre otras. Todos estos cambios están relacionados con el esfuerzo sintético necesario para regenerar el segmento faltante del axón y su membrana (Fu y Gordon, 1997).

Una serie de cambios extrínsecos a la neurona suceden en el extremo distal del nervio; estos cambios son conocidos como la degeneración walleriana. Estas modificaciones del extremo distal son importantes para la quimioatracción y la formación de un sustrato favorable para la regeneración de las fibras. Estos cambios ocurren a diferentes niveles: morfológico, bioquímico y molecular.

A nivel morfológico algunos de los cambios principales son:

- Destrucción de los axones (Griffin y Hoffman, 1993).
- Proliferación de las células de Schwann (Cheng *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995b).
- Colonización de la extremidad distal por macrófagos y otras células inflamatorias (Avellino *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995a).
- Destrucción de la mielina (Liu *et al.*, 1995b).
- Formación de las bandas de Büngner (Bunge, 1994).
- Incremento de la permeabilidad vascular (Griffin y Hoffman, 1993).

Estos cambios se manifiestan en factores bioquímicos y moleculares como:

- La re-expresión de moléculas de membrana, que inicialmente se expresan durante el desarrollo como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el receptor para este factor (rNGF), la molécula de adhesión celular neural (N-CAM), la L1 y el galactocerebrósido (Sciacco *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995a).
- La disminución y eventual desaparición de la proteína S-100 y del factor de crecimiento nervioso ciliar (CNTF) por las células de Schwann (Spreca *et al.*, 1989).
- La suspensión de la síntesis de proteínas de la mielina como la Po, la proteína básica de la mielina (MBP), PMP-22 y glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Scherer *et al.*, 1994).
- La síntesis del factor inhibitorio de la leucemia (LIF), del NGF, del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), del factor de crecimiento transformante p (TGFP), y de la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43) por las células giales (Curtis *et al.*, 1994; Scherer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995b).
- La síntesis elevada de colágeno tipos I y III por los fibroblastos y su acumulación en el extremo distal (Siironen *et al.*, 1992; Siironen *et al.*, 1995).

- La pérdida de la subunidad $\beta 4$ de la integrina por las células de Schwann (Niessen *et al.*, 1994).
- El reciclaje parcial de lípidos en las células de Schwann (Goodrum *et al.*, 1994).

La denervación crónica también lleva a una disminución considerable o incluso a la muerte de las células de Schwann, la destrucción de las láminas basales y la fibrotización exagerada del endoneurio (Griffin *et al.*, 1993), hechos que restringen considerablemente la capacidad del tronco nervioso para soportar el crecimiento de las fibras provenientes de la extremidad proximal (Siironen *et al.*, 1995).

Numerosos estudios han demostrado que las células de Schwann son importantes para la regeneración del sistema nervioso. Estas células producen una serie de moléculas que favorecen el crecimiento de las fibras nerviosas. Estas moléculas pueden ser solubles como el NGF. El LIF, el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y otros están asociados a la matriz extracelular; especialmente a la lámina basal, como el complejo protoglicano-laminina. Estas características han permitido a los investigadores utilizar la implantación de estas células para promover la regeneración, tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico (SNP). Se han incluido células de Schwann en geles con el fin de promover la regeneración en el SNC (Xu *et al.*, 1995); más aún, se ha demostrado que la glía periférica (células de Schwann) puede contrarrestar la inhibición ocasionada por la glía central, al menos de los astrocitos (Guenard *et al.*, 1994). En el SNP se conoce que las células sobreviven a la implantación y estimulan la regeneración y la mielinización (Kim *et al.*, 1994). Además se ha sugerido que las células pueden utilizarse para el tratamiento de las neuropatías desmielinizantes (Van der Berg *et al.*, 1995).

Algunos marcadores utilizados para diferenciar células de Schwann en cultivo incluyen proteínas como la S-100 y la GFAP. La proteína S-100 pertenece a una superfamilia de proteínas de unión al calcio que pueden regular diversas funciones celulares, incluyendo la comunicación intercelular, crecimiento y estructura celular, así como el metabolismo y transducción de señales intracelulares. Esta proteína se expresa en diversos tipos celulares, incluyendo las células giales (Zimmer, *et al.*, 1995).

La proteína acida fibrilar glial (GFAP), es un miembro de un grupo heterogéneo de filamentos intermedios que se encuentran en las células giales tanto del sistema nervioso central como del periférico (Stephenson y Byers, 1995). Como marcador no radiactivo de células que entran en fase S, se utiliza la bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, que se incorpora dentro del ADN en el momento

de su replicación, permitiendo así detectar las células que entran en fase S del ciclo celular, el cual puede ser detectado inmunocitoquímicamente (Rahirant *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta los hechos mencionados anteriormente, en el Laboratorio de Neurociencias del Instituto Nacional de Salud hemos iniciado una serie de trabajos encaminados al desarrollo de prótesis bioartificiales para el tratamiento de lesiones del nervio periférico. En ese contexto, se requieren profundos estudios *in vitro* para definir condiciones adecuadas para soportar la regeneración, de tal manera que las prótesis así desarrolladas puedan ser ensayadas *in vivo* en modelos animales, y eventualmente en seres humanos. En este artículo reportamos algunas observaciones sobre la biología de la célula de Schwann de rata en cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y cultivo de células de Schwann (Morgan *et al.*, 1991; Anselin, 1995; Morrissey *et al.*, 1991; Casella *et al.*, 1996; Garavito, 1996; Muñeton *et al.*, 1998; Garavito *et al.*, en prensa).

Se realizaron en total 24 cultivos primarios a partir de ratas Wistar adultas (200-250 g de peso corporal) obtenidas del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Se realizaron tres procedimientos diferentes para la obtención de cultivos enriquecidos en células de Schwann. Los métodos incluyeron:

- Explantes mantenidos en suspensión durante catorce días, posteriormente disociados, y las células obtenidas se cultivaron en un medio con o sin mitógenos (forskolina y extracto de pituitaria).
- Explantes adheridos a un sustrato de colágeno, se reexplantaron 3-4 veces en un tiempo no mayor a 2 meses, posteriormente se disociaron, y se mantuvieron en un medio con o sin mitógenos.
- Disociación directa de los explantes y las células se mantuvieron en un medio con o sin mitógenos.

Para llevar a cabo la obtención de las células, los animales se sacrificaron por decapitación. Una vez listo el animal, se bañó su dorso en alcohol antiséptico, se disecó la piel, se tuvo acceso a los músculos de la pierna y finalmente al nervio ciático. Se obtuvieron los dos nervios ciáticos de cada animal, a los cuales se les retiró el epineuro bajo estereoscopia y luego se cortaron en trozos de aproximadamente 1 mm³.

Se utilizaron dos tipos de medio para el mantenimiento de las células en el estudio, un medio con mitógenos que contenía DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco),

suero fetal bovino al 10%, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 mg/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml, forskolina 2 µM y extracto de pituitaria 20µg/ml, y un medio que contenía lo mismo que el anterior pero sin mitógenos (forskolina y extracto). Los explantes obtenidos fueron procesados de diferentes maneras, y se agruparon así:

Grupo 1

Tres cultivos primarios que se sometieron a disociación enzimática directa (inmediatamente obtenidos los explantes), con una combinación de dispasa 0,4 U/ml y colagenasa 80 U/ml, durante toda la noche. Posterior a la disociación, la mitad de las células se trataron con un medio que contenía mitógenos y la otra mitad con un medio sin éstos. Las células se sembraron en cajas de poliestireno de 6 pozos cubiertos con colágeno tipo I al 0,01 %. Se sembraron 9 pozos por cada condición, con un promedio de 50.000-100.000 células por pozo.

Grupo 2

Los explantes se sometieron al mismo procedimiento de disociación pero después de mantenerse en suspensión durante catorce días, la mitad de los explantes siempre estuvo en presencia de mitógenos, mientras que la otra mitad no. Las células provenientes de cada grupo de explantes fueron divididas en dos; las primeras fueron mantenidas con mitógenos y las restantes no. Posterior a su disociación, todas las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos cubiertas con colágeno tipo I. Se sembraron 9 pozos por cada condición, con un promedio de 250.000 células por pozo.

Grupo 3

Un tercer grupo de explantes adheridos a un sustrato de colágeno tipo I, se reexplantaron en tres ocasiones distintas en un período aproximado de dos meses, y posteriormente se disociaron y se mantuvieron como el grupo anterior. La siembra de los explantes y de las células posterior a la disociación igualmente se hizo en cajas de poliestireno de 6 pozos sobre un sustrato de colágeno tipo I. Se sembraron 9 pozos por cada condición con un promedio de 200.000 células por pozo.

Grupo 4

Explantes que después de haber estado suspendidos por catorce días en medio DMEM suplementado con suero se disociaron enzimáticamente y una vez adheridas las células se sometió la mitad de éstas a concentraciones diferentes de forskolina (2,10 y 20 µM), más extracto de pituitaria en la misma concentración (20 mg/ml). La otra mitad se

mantuvo en un medio sin mitógenos. Se sembraron 9 pozos por cada condición con un promedio de 250.000 células por pozo.

Grupo 5

Similar al grupo 2, pero las células se sembraron en cajas de 24 pozos sobre cubreobjetos cubiertos con colágeno tipo I (0,01%). Se sembró un promedio de 50.000 células por pozo. A este grupo se le realizó la detección inmunocitoquímica de las proteínas S-100, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), o de la bromodeoxiuridina (BrdU) incorporada por las células, a los 3, 5, 7, 12 y 15 días.

Inmunocitoquímica

A los cultivos de células obtenidos en el grupo 5 se les realizó una inmunodetección para S-100, GFAP o BrdU. Para realizar la detección se fijaron las células en paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se lavaron con buffer fosfato y se permeabilizaron con Tritón X-100, preparado en el buffer. Luego se bloquearon los sitios inespecíficos con suero de caballo y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti S-100 (1:500), policlonal anti GFAP (1:16) o monoclonal anti BrdU (1:80) a 37 grados centígrados durante una hora.

En el caso de la detección de la BrdU incorporada, previo a la incubación con el anticuerpo primario, se llevó a cabo la desnaturalización del ADN con HCl 2N durante 30 minutos seguida de una neutralización con tetraborato de sodio 0.1 M a pH 8,5 durante 10 minutos. Después de realizar los lavados pertinentes se incubaron los cultivos con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó el complejo avidina- biotina-peroxidasa a una dilución 1:100; se incubó por 45 minutos. El revelado se hizo con diaminobenzidina, luego se realizó una contracoloración con Hemalun de Meyer, y se deshidrató e hizo el montaje sobre láminas portaobjetos.

Conteos

De los cultivos del grupo 5 a los cuales se les realizó inmunodetección para S-100, GFAP o BrdU, se contaron 500 células por pozo y en cada caso se contó un mínimo de 9 pozos distinguiendo tipos morfológicos: células de Schwann bipolares o tripolares, con prolongaciones largas, forma ahusada y núcleos pequeños, o fibroblastos grandes, con citoplasma explayado, poco denso y con núcleos grandes y presencia o ausencia del respectivo marcador.

RESULTADOS

Después de haber llevado un seguimiento y control de todos los cultivos por observación en microscopio de contraste de fases se hicieron las siguientes observaciones cualitativas:

Grupo 1

En este grupo los explantes se disociaron inmediatamente fueron obtenidos. El producto de esta disociación fue gran cantidad de células con morfología fibroblástica y menor cantidad de células con morfología Schwann; se obtuvo un promedio de 6×10^4 células/ml, con adición o no de mitógenos. Así mismo se observó gran cantidad de detritos de mielina y pocas células sueltas a pesar del tiempo de disociación. La viabilidad celular tuvo un promedio de 95%.

Grupo 2

Los explantes se mantuvieron en suspensión, y pasados 14 días fueron disociados en una mezcla de colagenasa 0,04% y dispasa 0,2%. El número de células en el momento de la siembra arrojan un promedio de 2×10^5 células/ml. Este método mostró los mejores resultados en el estudio, por lo que se observa gran cantidad de células con morfología Schwann y pocas con morfología fibroblástica (figura 1A). Se observó excelente adhesión de las células al sustituto dentro de la primera semana de haber sembrado las células.

Grupo 3

En 3 ocasiones el reexplante secuencial de los explantes se realizó en un tiempo aproximado de 8 semanas. Este procedimiento permite eliminar gran cantidad de fibroblastos presentes en el nervio periférico, al mismo tiempo que se enriquecen los explantes con células de Schwann (figura 1B). Aparentemente se obtienen resultados similares al método de explantes en suspensión. Este método presenta desventajas tales como el tiempo que se requiere para la obtención de las células, el gasto de reactivos y materiales para el mantenimiento del cultivo y las mayores probabilidades de contaminación por la gran cantidad de manipulación que conlleva.

Grupo 4

De acuerdo con los resultados obtenidos con la técnica de explantes en suspensión, en la cual no se observaron diferencias en el enriquecimiento en presencia o ausencia de mitógenos, se evaluaron mayores concentraciones de forskolina con el fin de observar su efecto sobre el enriquecimiento. Sin embargo, en los cultivos que tuvieron un man-

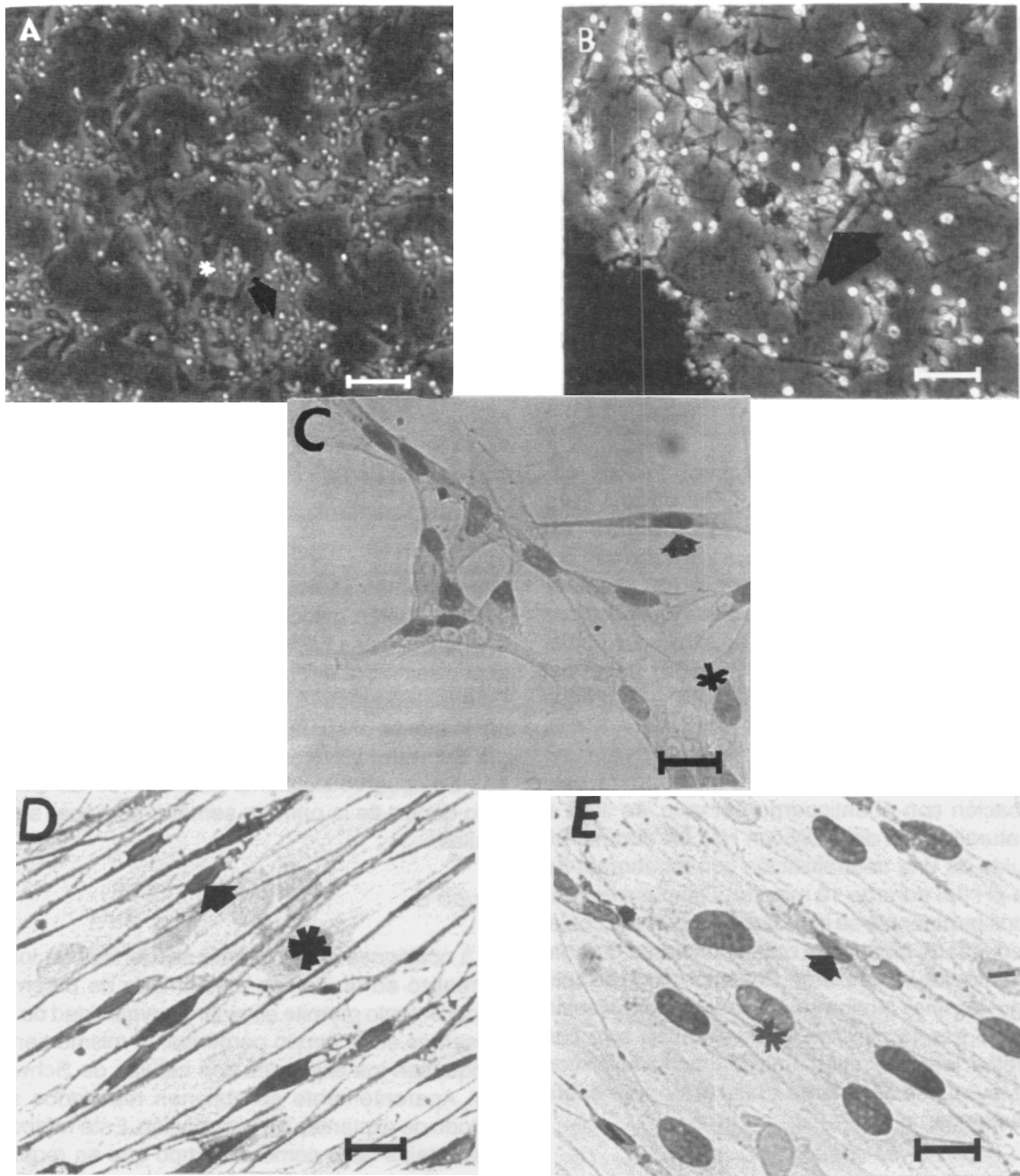


Figura 1.

- A. 200X. Células de Schwann 4 días en cultivo. Disociado después de 14 días. Nótese la refringencia de las células de Schwann (flecha) y la presencia de algunos fibroblastos (*). Barra 1 cm = 50µm.
- B. 200X. Tercer reexplante. Observe el enriquecimiento del cultivo con células de Schwann (flecha) a partir del explante. Barra 1 cm = 50µm
- C. 1.400X. Control negativo. Inmunocitoquímica, contracoloración hemalun de Meyer. Véase el color violeta de las células con morfología Schwann (flecha) y fibroblástica (*). Barra 1 cm = 7µm.
- D. 1.400X. Inmunocitoquímica para GFAR. Mareaje de células de Schwann de color marrón (flecha), al fondo fibroblastos contracolorados con hemalun de Meyer de color violeta (*). Barra 1 cm = 7µm.
- E. 1.400X. Inmunocitoquímica para BrdU. Note el mareaje de núcleos de células de Schwann (flecha) y el de células con morfología fibroblasto (*) ambos de color marrón. Nótese algunos núcleos no marcados de color violeta (-). Barra 1 cm = 7µm.

tenimiento con forskolina 10 y 20 μ M, la adhesión celular fue bastante pobre y la morfología de las células varió; se observaron células con morfología fibroblástica bastante grandes redondeadas y núcleos prominentes. Se observaron pocas células con morfología Schwann.

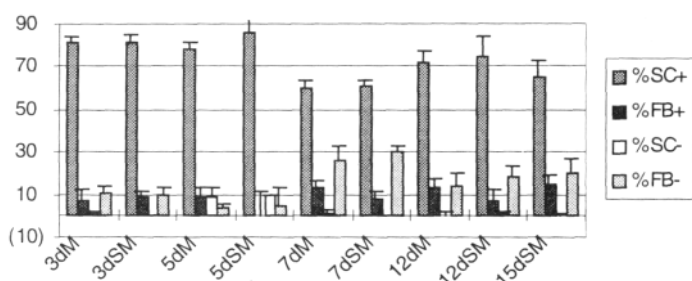
Grupo 5

En este grupo, al igual que en el anterior, se utilizó el método de explantes suspendidos pero en un medio sin mitógenos hasta su disociación. Una vez disociadas y adheridas las células, se sometió a la mitad de éstas a un medio con mitógenos. La mitad restante permaneció sin éstos. No se observaron diferencias marcadas, aparentemente. Como en el grupo 2, en los cultivos tratados con mitógenos las células con morfología Schwann, que son la mayoría, tuvieron una forma más alargada y presentaron una disposición de cadenas en toda la superficie del cultivo.

Inmunocitoquímica

Los resultados de las inmunocitoquímicas para S-100, GFAP y BrdU realizadas en este experimento se ilustran en la figura 1 (C, D y E), y en las gráficas 1, 2 y 3. Se resumen a continuación:

S-100 (gráfica 1)



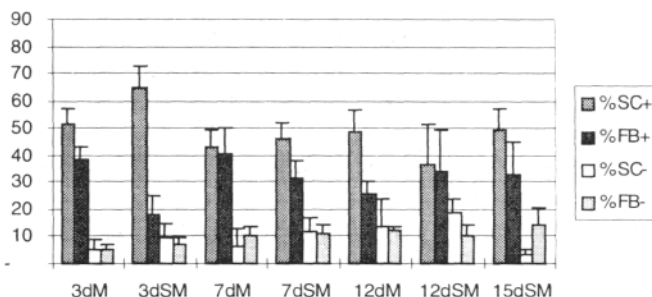
Gráfica 1. Porcentaje de expresión de S-100 en diferentes tiempos, en células con morfología Schwann y fibroblástica, con o sin mitógenos.

M: Mitógenos
SM: Sin mitógenos
d: Días

Los datos indican que el enriquecimiento de los cultivos en células de Schwann positivas a los tres días se encuentra en alrededor de un 81%. A partir del día 7 hay una ligera disminución del porcentaje de células de Schwann positivas, y permanece a partir de este día relativamente constante hasta el día 15. No parece haber diferencia entre los grupos con y sin mitógenos. El porcentaje de células de Schwann no marcadas es muy bajo en ambos grupos. La

población de fibroblastos no marcados aumenta a partir de los 7 días, permaneciendo constante hasta el día 15.

GFAP (gráfica 2)

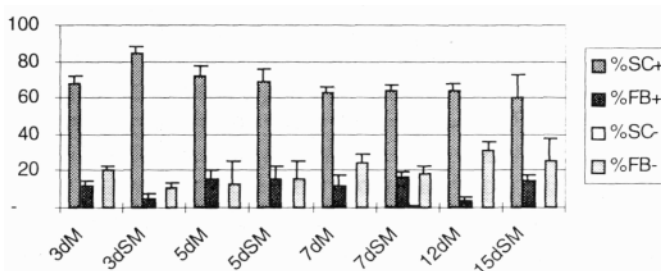


Gráfica 2. Porcentaje de expresión de GFAP en diferentes tiempos, en células con morfología Schwann (SC+, SC-) y fibroblástica (FB+, FB-), con o sin mitógenos.

M: Mitógenos
SM: Sin mitógenos
d: Días

El comportamiento de los cultivos a los cuales se les realizó inmunocitoquímica para GFAP es similar al encontrado en S-100. No hay cambios evidentes entre los grupos tratados y no tratados con mitógenos. Así mismo el enriquecimiento disminuye ligeramente en el día 7 y permanece casi constante hasta el día 15. La población de células con morfología fibroblástica que no expresan GFAP aumenta con el tiempo y es ligeramente mayor a la encontrada en S-100. Al igual que en S-100, las células con morfología típica Schwann que no expresan GFAP son muy pocas.

BrdU (gráfica 3)



Gráfica 3. Porcentaje de proliferación (incorporación BrdU) en diferentes tiempos, en células con morfología Schwann (SC+, SC-) y fibroblástica (FB+, FB-), con o sin mitógenos.

M: Mitógenos
SM: Sin mitógenos
d: Días

La proliferación en el día 3 de células de Schwann es alrededor de un 60 a 65% para los cultivos tratados con mitógenos; es un poco menor en los no tratados con los mismos (55%). En el mismo tiempo, la población de fibroblastos prolifera alrededor de un 30 a 40% y la población de células de Schwann que no prolifera es casi de 10%. No es muy grande la diferencia entre los grupos tratados con y sin mitógenos. En el día 7 disminuye la proliferación tanto de la población de células de Schwann como la de los fibroblastos, que es alrededor de un 50%; no hay cambios evidentes entre los grupos. A partir del día 7, y hasta el día 15, se mantiene relativamente constante la proliferación de células de Schwann y de fibroblastos, aumentando poco a poco la población de fibroblastos que no prolifera. Así mismo, los datos son similares entre los grupos mantenidos con y sin mitógenos.

CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvieron cultivos enriquecidos de células de Schwann de ratas adultas, con el objetivo de generar perspectivas futuras de terapias de regeneración nerviosa. El método con el que se obtuvo gran cantidad de células con morfología Schwann fue el de explantes en suspensión durante 14 días, que posteriormente fueron sometidos a una digestión enzimática con colágenasa y dispasa (66 U/ml/1,5 U/ml) durante toda la noche. Se ve gran cantidad de estas células, teniendo adicionalmente la ventaja de lograr un enriquecimiento en relativamente poco tiempo, muy probablemente, debido a que se permite que ocurra la degeneración walleriana *in vitro*.

Es evidente, a partir de los resultados, que el número de células de Schwann en fase S, obtenida por incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) es relativamente alta en estos cultivos. Sin embargo, también es el caso para los fibroblastos. Por tanto requerimos en el sistema la introducción de condiciones de cultivo que estimulen específicamente a las células giales. Una posibilidad es la aplicación de heregulinas, cuya actividad sobre las células de Schwann ha sido reportada recientemente (Morrissey *et al.*, 1991) y que ya son disponibles en el mercado. Sin embargo, y dado el costo de estos mitógenos, deben buscarse otras moléculas que tengan este efecto. Otra posibilidad es eliminar los fibroblastos selectivamente, como ocurría en los antiguos protocolos de cultivo de células de Schwann, en los cuales se utilizaba una mezcla de anti Thy-1 u complemento con el fin de lisar los fibroblastos.

A este respecto es importante resaltar que estamos trabajando con células adultas, que tienen una actividad basal de proliferación mayor que las células de recién nacido (al menos en condiciones normales de cultivo). Portante, y para

aplicar la lisis ya descrita, deberían buscarse condiciones de cultivo que inicialmente no permitan la proliferación de células de Schwann, pero que disparen la de los fibroblastos, con el fin de eliminar éstos, y a continuación aplicar mitógenos que actúen sobre las células giales.

El cultivo de células de Schwann provenientes de animales adultos tiene implicaciones potenciales grandes desde el punto de vista de la industria farmacéutica y de la ingeniería de tejidos. Se ha demostrado que estas células producen diferentes factores neurotróficos (especialmente NGF), e incluso se conocen algunas moléculas que pueden estimular esta producción (Fu y Gordon, 1997). Adicionalmente, se ha demostrado que el NGF puede eventualmente servir en el tratamiento de las neuropatías diabéticas y de las úlceras que estos pacientes presentan (Castellano *et al.*, 1998). Estos hechos resaltan la importancia del trabajo con células de Schwann, además de guiar el proceso de estudio y obtención de procedimientos que lleven a la regeneración del sistema nervioso periférico. Igualmente, en lo referente a la ingeniería de tejidos, el desarrollo de prótesis bioartificiales que combinen tubos de diferentes materiales, con matrices extracelulares y células de Schwann, están bajo examen en varios laboratorios en el mundo, con el fin de obtener mejores alternativas terapéuticas para las lesiones del sistema nervioso, tanto central como periférico. Sin embargo, este desarrollo todavía requiere investigación sobre la biología de estas células, de su interacción con matrices tridimensionales, y con otros tipos de células (como los fibroblastos). Estos modelos son mucho más cercanos a lo que puede ocurrir *in vivo*, y ésta es la razón por la cual hemos escogido esa vía de trabajo en nuestro laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias a la financiación del Instituto Nacional de Salud y de la Universidad Nacional de Colombia, dentro del marco del proyecto "Obtención, cultivo y caracterización inmunocitoquímica de células de Schwann. Un modelo de terapia celular".

REFERENCIAS

- Anselin, A. D., Corbeil, S. D. and Davey, D. F. 1995. Culture of Schwann cells from adult animals. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:253-254.
- Avellino, A. M., Hadrt, D., Dailey, A.T., Mackinnon, M., Ellegala, D. and Klot, A. 1995b. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. *Experimental Neurology* 136:183-198.
- Bellamkonda, R., Aebischer, P. 1994. Review: Tissue engineering in the nervous system. *Biotech. Bioengin.* 43:543-554.

- Boutros, T., Croze, E., Yong, V. W. 1997. Interferon beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *J. Neurochem.* 69:939-946.
- Bunge, R. R. 1994. The role of the schwann cell in trophic support and regeneration. *Journal Neurology* 349:327-338.
- Casella, G.T., Bunge, R. R., Wood, R.M. 1996. Improved method for harvesting juna Schwann cells from mature peripheral nerve and expansión *in vitro*. *Glia* 17:327-338.
- Castellano, O., Martínez-Martí, L., Gómez-Fernández, L. 1998. Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Rev. Neurol.* 26:1032-1039.
- Castellanos, J. and Hurtado, H. 1999. Viral infection studied in primary cultures of adult sensory neurons. In *Handbook of the neuron in tissue cultures*, Haynes, L. (Ed). 289-293. John Wiley and Sons.
- Celis, J. E., Madsen, R. 1994. Synchronization of transformed human amnion cells by mitotic detachment. In *Cell biology. A laboratory handbook*, Vol 1, Celis, J. Oxford Press, Inglaterra.
- Cheng, L., Khan, M., Mudge, S. 1995. Calcitonin gene-related peptide promotes schwann cell proliferation. *Journal of Cell Biology* 129:789-796.
- Collier, T. J. and Martin, R. N. 1993. Schwann cells as a source of neurotrophic activity for dopamine neurons. *Exp. Neurol.* 124:129-133.
- Conti, G., Stoll, G., Scarpini, E., Barón, R. L., Bianchi, R., Livraghi, S., Scarlato, G. 1997. p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp. Neurol.* 146:206-211.
- Cuello, A.C., Maysinger, D., Garofalo, L. 1992. Trophic factor effects on cholinergic innervation in the cerebral cortex of the adult rat brain. *Mol. Neurobiol.* 6:451-461.
- Curtis, R., Scherer, S. S., Somogy, R., Adryan, K. M., Lindsay, R. M., Distefano, R. S. 1994. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron* 12:191-204.
- Dong-Ryul, L., Kondo, H., Furukawa, S., Nakano, K. 1997. Stimulation of NGF production by tryptophan and its metabolites in cultured mouse astroglial cells. *Brain Res.* 777:228-230.
- Dumont, C. H., Bolín, L.M., Hentz, V. R. 1996. A composite nerve graft system: extracted rat peripheral nerve injected with cultured Schwann cells. *Músete & Nerve.* 19:97-99.
- Friden, R. M., Walus, L. R., Watson, R., Doctrow, S. R., Kozarich, J. W., Backman, C., Bergman, H., Hoffer, B., Bloom, R., Granholm, A. 1993. Blood-Brain barrier penetration an *in vivo* activity of an NGF conjugate. *Science* 259:373-377FU, S.Y.; Gordon, T. 1995.
- Fu, S. Y.; Gordon, T. 1995. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *Journal of Neurosciences* 15: 3876-3885
- Fu, S. Y. and Gordon, T. 1997. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobiol.* 14:67-116.
- Galve-Roperh, I., Haro, A., Díaz-Lalviada, I. 1997. Induction of nerve growth factor synthesis by sphingomyelinase and ceramide in primary astrocyte cultures. *Mol. Brain Res.* 52:90-97.
- Garavito, Z. Relación entre patrones morfológicos y la presencia de la proteína S-100 en células de Schwann de ratón adulto. Tesis de grado para optar al título de Biólogo. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. 1996.
- Garavito, Z. V., Sutachán, J. J.; Muñetón, V. C. and Hurtado, H. S-100 protein: a suitable marker for adult mouse Schwann cells cultured *in vitro*?. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* En prensa.
- Goodrum, J. F., Earnhardt, T.; Goines, N., Bouldin, T. W. 1994. Fate of myelin lipids during degeneration and regeneration of peripheral nerve: an autoradiographic study. *Journal of Neurosciences* 14:357-367.
- Griffin, J. W., Hoffman, P. N. 1993. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: *Peripheral Neuropathy*, Dick Thomas. 3^{ra} edición. Winston-Churchill. USA.
- Guenard, V., Aebischer, P. and Bunge, R. 1994. The astrocyte inhibition of peripheral nerve regeneration is reversed by Schwann cells. *Exp. Neuro.* 126:44-60.
- Heath, C. A., Rutkowski, G. E. 1998. The development of a bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Tibtech* 16:163-168.
- Heese, H., Fiebich, B. L., Bauer, J., Otten, U. 1997. Nerve growth factor (NGF) expresión in rat microglia is induced by adenosine A2a receptors. *Neurosci. Lett.* 231:83-86.
- Hurtado, H., Knoops, B., Van den Bosch de Aguilar. 1987. Rat sciatic nerve regeneration in semipermeable artificial tubes. *Exp. Neurol.* 97:751-757.
- Hurtado, H., De Permentier, F., Waterloo, G y Van des Bosch de Aguilar, R. 1988. Silicone regeneration chamber fluids. Effects on adult rat sciatic fibroblasts survival and proliferation. *Eur. J. Neurosci.* 11 Congreso de la Sociedad Europea de Neurociencias. 206.
- Hurtado, H. 1990. Peripheral nervous system regeneration in the adult rat: "The regeneration chamber". Doctoral Thesis. Université Catholique de Louvain, Belgium.
- 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 .
- Hurtado, H. 1997. Efecto de la permeabilidad en la regeneración del nervio ciático entubado de rata. *Biomédica* 17:27-33.
- Kaechi, K, Ikegami, R., Nakamura, N., Nakajima, M., Furukawa, Y, Furukawa, S. 1995. 4-methylcatechol, an inducer of nerve growth factor synthesis, enhances peripheral nerve regeneration across nerve gaps. *J. Pharm. Exp. Ther.* 272:1300-1304.
- Karlsson, J. E., Rosengren, L. E., Wang, S., Danielsen, N., and Haglid, K. G. 1993. Glial and Neuronal Marker Proteins in Silicone Chamber Model for Nerve regeneration. *J. Neurochem*, 60,1098-1104.
- Kim, D. H., Connolly, S. E., Kline, D. G., Voorhies, R. M., Smith, A., Powell, M., Yoes, T. and Danioff, J. K. 1994. Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair. *J. Neurosurg.* 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 a silicon impermeable material. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 49:438-448.
- Labrador, R. O., Butí, M., and Navarro, X. 1998. Influence Collagen and Laminin Gels Concentration on Nerve Regeneration after Resection and Tube Repair. *Experimental Neurology*. 149, 243-252.
- Levi, A. D. O., Guenard, V., Aebischer, P. and Bunge, R. P. 1994. The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J. Neurosci.* 14:1309-1319.
- Levi, A. D. O. and Bunge, R. P. 1994. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe

combined immunodeficient mouse. *Exp. Neurol.* 130:41-52.

Levi, A. D. O., Sontag, V. K.; Dickman, C., Mather, J.; Lj, R. H.; Córdoba, S. C., Bichard, B. and Berens, M. 1997. The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous system of primates. *Exp. Neurol.* 143:25-36.

Liu, H., Lei, O., Kao, T. 1995a. Correlation between NGF levels in wound chamber fluid and cytological localization of NGF and NGF receptor in axotomized rat sciatic nerve. *Experimental Neurology* 132:24-32.

Liu, H., Yand, L. H., Yang, L. 1995b. Schwann cell properties: c-fos expression, BFGF production, phagocytosis and proliferation during wallerian degeneration. *J. Neuropathology and experimental neurology* 54: 487-496.

Longo, M. R., et al. 1984. Neurite-Promoting Factors and Extracellular Matrix Components Accumulating In Vivo Within Nerve Regeneration Chamber. *Brain Research.* 309, 105-117.

López, A. y Hurtado, H. 1993. La célula de Schwann. *Biomédica.* 13(4):207-217.

Lowrie, M. B.; Lavalette, D., Davies, C. E. 1994. Time course of motoneuron death after neonatal sciatic nerve crush in the rat. *Dev. Neurosci.* 16:279-284.

Malgrange, B., Delree, R., Rigo, J. M., Barón, H., Moone, G. 1994. Image analysis of neuritic regeneration by adult rat dorsal root ganglion neurons in culture: quantification of the neurotoxicity of anticancer agents and of its prevention by nerve growth factor or basic fibroblast growth factor but not brain derived neurotrophic factor or neurotrophin 3. *J. Neurosci. Meth.* 53:111-122.

Mohiuddin, L., Tomlinson, D. R. 1997. Impaired molecular regenerative responses in sensory neurons of diabetic rats: gene expression changes in dorsal root ganglia after sciatic nerve crush. *Diabetes* 46:2057-2062.

Morgan, L., Jessen, K. R. and Mirsky, R. 1991. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: Progression from an early phenotype (O4+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor) depends on growth inhibition. *J. Cell Ecol.* 112:457-467.

Morrissey, T. K., Kleitman, N., and Bunge, R. P. 1991. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J. Neurosci.* 11: 2433-2442.

Muñetón, V.C., Garavito, Z. V., Hurtado, H. 1998. Cultivo de células de Schwann. Un modelo del microambiente del sistema nervioso. *Biomédica.* 18:45-54.

Navarro, X., Tranquillo, R., Labrador, R. 1998. Stimulation and Recording from Regenerated Peripheral Nerves through Polyimide Sieve Electrodes. *J. Peripheral Nervous System*, 3 (2), 91-101.

Niessen, C. M., Cremona, O., Daams, H., Ferraresi, S., Sonnenberg, A y Marchisio, P. C. 1994. Expression of the integrin $\alpha 6 \beta 4$ in peripheral nerves: localization in Schwann and perineurial cells and different variants of the $\beta 4$ subunit. *J. cell science* 107: 543-552.

Petty, B. G., Corblath, D. R., Adornate, B. T., Chaudhry, V., Flexner, C., Wachsman, M., Sinicropi, D., Burton, L. E., Peroutka, S. J. 1994. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol.* 36:244-246.

Peulve, R., Laquerriere, A., Paresy, M., Hemet, J. and Tadie, M., 1994. Establishment of Adult Rat Schwann Cell Cultures: Effect of b-FGF, α -MSH, NGF, PDGF, and TGF- β on Cell Cycle. *Experimental Cell Research* .214, 453-550.

Piccardo, R., Maysinger, D., Cuello, A. C. 1992. Recovery of nucleus basalis cholinergic neurons by grafting NGF secretor fibroblasts. *Neuroreport* 3:353-356.

Polit, D., Hungler, B. 1994. Investigación científica en ciencias de la salud. McGraw Hill 4 ed. México.

Pshenichkin, S. R., Wise, B. C. 1997. Okadaic acid stimulates nerve growth factor production via an induction of interleukin 1 in primary cultures of cortical astroglial cells. *Neurochem Int.* 30:507-514.

Rahirant, S., Garavito, Z., Hurtado, H. 2000. Descripción de una técnica inmunocitoquímica para evaluar proliferación de células en cultivo por incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU). *Biomédica.* En prensa.

Scarpini, E., Beretta, S., Ross, A. H., Moggio, M., Jann, S., Pleasure, D., Scarlato, G. 1989. Rapid quantitative immunohistochemical assessment of human peripheral neuropathies using a monoclonal antibody against nerve growth factor receptor. *J. Neurol.* 236:439-444.

Scherer, S. S., Xu, Y. T., Roling, D., Wrabetz, N., Feltri, Y., Kamholtz, C. 1994. Expression of growth associated protein-43 KD in Schwann cells is regulated by axon-Schwann cell interactions and cAMP. *Journal of Neuroscience Research* 38:575-589.

Sciacco, N., Scarpini, E., Barón, R., Doronzo, R., Moggio, M., Passerini, D., Scarlato, G. 1993. Sural nerve immunoreactivity for nerve growth factor receptor in a case of localized hypertrophic neuropathy. *Acta Neuropathol.* 83:547-553.

Siironen, J., Sandberg, M., Vourinen, V., Roytja, M. 1992. Expression of type I and III collagens and fibronectin after transection of rat sciatic nerve. *Lab. Invest* 67:80-87

Siironen, J., Vourinen, V., Taskinen, H., Roytja, M. 1995. Axonal regeneration into chronically denervated distal stump. Active expression of type I collagen mRNA in epineurium. *Acta Neuropathol.* 89:219-226.

Spreca, A., Rambotti, M., Saccardi, C., Aisa, M., Giambanco, I., Donato, R. 1989. Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerve. *Journal of Histochemistry and cytochemistry* 37: 441 -446.

Stephenson, J., Byers, M. 1995. GFAP immunoreactivity in trigeminal ganglion satellite cells after Tooth injury Rats. *Experimental Neurology* 131:11 -22.

Van den Berg, L. H., Bar, R. R., Soodar, R., Mollee, L., Wokke, J. H. and Logtenberg, T. 1995. Selective expansion and long term culture of human Schwann cells from sural nerve biopsies. *Ann. Neurol.* 38:674-678.

Williams, L. R., Longo, F. M., Powell, H. C., Lundborg, G., Varón, S. 1983. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: Parameters for a bioassay. *J. Comp. Neurol.* 218:460-470.

Williams, L. R., Varón, S. 1985. Modification of fibrin matrix formation in situ enhances nerve regeneration in silicone chambers. *J Comp Neurol*, 231:209-220.

Wion, D., Mac Grogan, D., Houlgatte, R., Brachet, P. Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) increases the expression of the nerve growth factor (NGF) gene in mouse L-929 fibroblasts. *FEBS Lett.* 1990,262:42-44.

Wood, P. M., Bunge, R. 1975. Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Natura* 256: 662-667.

Xu, X. M., Guenard, V., Kleitman, N. and Bunge, M. B. 1995. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 351:145-160.

Yamaguchi, K., Sasano, A., Urakami, T., Tsuji, T., Kondo, K. 1993. Stimulation of Nerve Growth Factor production by pyrroloquinoline Quinone and its derivatives *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 54:1231-1233.

Zimmer, D., Cornwall, E., Landar, A., Song, W. 1995. The S100 Protein Family: History, Function and Expression. *Brain Research* Vol. 37, No. 4 pp. 417-429.