



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación *in vitro* de factores estimuladores e inhibidores de neuroregeneración presentes en cultivos celulares de la glía envolvente olfatoria

Magdy Yomar Sánchez Molina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Genética
Maestría en Neurociencias
2016

Evaluación *in vitro* de factores estimuladores e inhibidores de neuroregeneración presentes en cultivos celulares de la glía envolvente olfatoria

Magdy Yomar Sánchez Molina

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Neurociencias**

Directora:

Rosa Margarita Gómez Bello. Biol., MSc., PhD.

Co- director:

Doctor Orlando Chaparro. Biol., MSc., PhD.

Doctora Rosa Helena Bustos. QF., PhD.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Genética
Maestría en Neurociencias
2016

A mis padres, mis hermanos y a mi abuela María Magdalena por todo lo que me han dado a lo largo de mi vida, por su amor, entereza y su dedicación, porque me enseñaron a distinguir lo bueno y me criaron en un medio sano lleno de valores y principios siendo un ejemplo de perseverancia, constancia y disciplina que me han sembrado siempre, para ellos este trabajo va, como una muestra de gratitud. A mi píoja Martina por darle a mi vida una alegría diferente enseñándome en un gesto pequeño las grandeza de la vida.

Agradecimientos

A la Dra. Rosa Margarita Gómez B. Biol., MSc., PhD. Directora de la tesis. Por su desinteresada colaboración y por su generosidad al compartir los conocimientos y la experiencia de años de trabajo, además por el apoyo que siempre ha mostrado hacia mí en el campo profesional y personal como un ejemplo a seguir.

A la Dra. Rosa Helena Bustos. QF., PhD. Por su asesoría, apoyo y acompañamiento en la técnica, protocolos, manejo del biosensor y desarrollo de la investigación.

Al Dr. Orlando Chaparro G. Biol., PhD. Co-director de la tesis por su apoyo incondicional e indicaciones durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Lucía Botero Espinosa., MV. MSc., PhD. De quien obtuve el apoyo y colaboración en el manejo de las cirugías del modelo animal y en las primeras fases de los cultivos celulares.

A la Dra. María Fernanda Quiroz., PhD. Por su colaboración en el uso del laboratorio de comportamiento biológico por su amistad e interés constante a lo largo del desarrollo del trabajo.

A la Dra. María Teresa Moreno- Flores., PhD. y al Dr. Francisco Wandosell., PhD. Del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Facultad de Ciencias., Universidad Autónoma de Madrid., España por donar células de la glía envolvente olfatorias inmortalizadas TEG3.

Al Dr. Kemel A. Ghotme., MD., Neurocirujano pediatra. Por su inigualable apoyo en mi formación profesional e investigativa y por ser una guía durante la realización de esta investigación.

A la Maestría en Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia y a sus profesores por la educación recibida en el programa que me permitieron culminar mis estudios.

Al Laboratorio de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina en donde se desarrollaron las fases de cultivos celulares y citometría de flujo.

A Yolanda Cárdenas., Coordinadora de los Laboratorios de Equipos Comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional. Por su colaboración y soporte en el desarrollo de protocolos y en el uso de las instalaciones.

Juan Pablo López Cooper., Presidente de NUTERMIA SAS., Por prestarme las instalaciones del Laboratorio y el Biosensor para realizar los experimentos.

A David Bernal y Paola Montero, estudiantes del doctorado de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia por su colaboración en las Citometrías

A mis padres Francisco Omar Sánchez Palacios y Magda Coromoto Molina de Sánchez, Por darme la oportunidad de caminar en la investigación y por personificar el amor que todo lo da y nada reclama.

A mis hermanos Maryi Naitsaby Sánchez Molina y Francisco Omar Sánchez Molina, Por apoyarme en mi desarrollo profesional y personal.

A Manuel Antonio Colorado Blanco,. Por el amor que me ha profesado; por la cercanía que nos une, por su generosidad y por el apoyo incondicional que siempre ha mostrado hacia mí y mis quehaceres.

A la fisioterapeuta María Andrea Domínguez Sánchez., Por su amistad y valiosos aportes al desarrollo de la investigación.

A las entidades financieras que me patrocinaron la investigación Fundación de Neuroregeneración en Colombia (NEURORECOL) y a mis padres Francisco Omar Sánchez Palacios y Magda Coromoto Molina de Sánchez, sin las cuales no se hubiera podido desarrollar la investigación.

A todos mis compañeros de programa de Maestría en Neurociencias quienes me ayudaron en las áreas del conocimiento que cada uno de ellos tenían experticia.

A todas las personas que de una u otra forma, me dieron la fortaleza necesaria para seguir adelante.

Resumen

Las células de la glía envolvente olfatoria (CGEO) son promotoras de la regeneración celular en el sistema nervioso debido a su inherente capacidad de fomentar la continua regeneración de neuronas olfatorias. Su mecanismo de acción se ha estudiado en modelos animales para favorecer la recuperación de la función locomotora en lesión medular. Estas células secretan proteínas como factores de crecimiento, factores proangiogénicos y angiogénicos, que ayudan a que ocurran procesos de neuroregeneración pero también factores que son inhibitorios de dichos procesos. Aunque se ha evaluado el efecto de estos factores en los procesos de neuroregeneración mediados por CGEO, no existen estudios en la literatura que cuantifiquen la concentración de los mismos en medios de cultivos celulares con el fin de identificar cuáles serían más idóneos como blancos terapéuticos en modelos experimentales de regeneración medular. La presente investigación tuvo como finalidad la evaluación cuantitativa (análisis estadístico) de la expresión *in vitro* de factores de crecimiento solubles promotores como factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), Neurotrofina-3 (NT-3) y Neurotrofina-4 (NT-4) así como de factores proteicos solubles inhibidores tales como glicoproteínas asociadas a la mielina MAG entre ellas NOGO-A, mediante el uso de una tecnología nanosensora, tanto en medios de cultivo como en CGEO en suspensión obtenidas de cultivos primarios de lámina propia (LP) y bulbo olfatorio (BO) de ratas Wistar neonatales y en CGEO transfectadas (TEG3), obtenidas de BO de ratas Wistar adultas. Los biosensores permitieron identificar que NT-3 fue el factor promotor en CGEO de LP con mayor concentración de 21,1 ug/mL en medios condicionados y 23,7 ug/mL en CGEO de BO como suspensión celular, mientras que el factor inhibidor con mayor concentración fue NOGO-A con 76,4 ug/mL en medios condicionados de LP y 125,5 ug/mL en CGEO de LP como suspensión celular. Los resultados mostraron para todas las concentraciones de los factores estimuladores e inhibidores una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) en medios condicionados entre las células de BO y de LP en relación al tiempo. Adicionalmente, en las CGEO como analito se encontró una diferencia significativa de ($p < 0.05$) en la expresión de NOGO-A, los demás factores presentaron concentraciones similares en ambos tipos celulares (LP y BO) con un ($P > 0.05$). Finalmente, en las TEG3 como analito NOGO-A tuvo una concentración de 3,35 ug/mL y el resto de factores presentó concentraciones muy bajas. De lo anterior se concluye que la potenciación de la NT-3 como factor estimulador y la modulación de NOGO-A como factor inhibidor, en CGEO obtenidas de LP y BO neonatales, serían objetivos terapéuticos idóneos en modelos experimentales de neuroregeneración.

Palabras Clave : Células de la glía envolvente olfatoria (CGEO), Neuroregeneración, Factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), Neurotrofina 3 (NT-3), Neurotrofina 4 (NT-4), Proteína asociada a la mielina presente en retículo endoplásmico (NOGO-A), Glicoproteína asociada a la mielina (MAG), Resonancia de Plasmón Superficial (SPR).

Abstract

The olfactory ensheathing cells (OECs) are promoters of cell regeneration in the nervous system due to its inherent ability to support continuous regeneration of olfactory neurons. Its mechanism of action has been studied in animal models to assist the recovery of locomotive function in spinal cord injury. These cells secrete proteins such as growth factors, angiogenic and pro angiogenic factors, which help neuroregeneration processes to occur but they also secrete factors that are inhibitory to these processes. Although the impact of these factors on the neuroregeneration processes mediated by OECs has been assessed, there are no studies in the literature that quantify the concentration there of in cell cultures in order to identify which would be more suitable as therapeutic targets in experimental models for spinal cord regeneration. This research was aimed at the quantitative evaluation and *in vitro* expression of soluble growth factors promoters such as acidic fibroblast growth factor (aFGF), Neurotrophin-3 (NT-3) and Neurotrophin-4 (NT-4) as well as soluble protein inhibitor factors as myelin-associated glycoprotein MAG among them NOGO-A, using a Nano sensing technology, both in conditioned culture media as in a OECs suspension obtained from primary cultures of lamina propria and neonatal Wistar rat olfactory bulb and transfected OECs (TEG3) obtained from the olfactory bulb of adult Wistar rats. The biosensors allowed the identification of NT-3 as the promoter factor in OECs LP with the highest concentration (21,1 ug/mL in conditioned media and 23,7ug/mL in OECs as a cellular suspension), while the inhibitor factor with the highest concentration was NOGO-A (76,4 ug/mL in conditioned media in LP and 4,54 ug/mL in OECs as a LP cellular suspension). The results showed for all concentrations of the promoters and inhibitory factors a highly significant difference ($p < 0.01$) between the cells conditioned BO and LP in relation to time. Additionally, in CGEO as analyte significant difference ($p < 0.05$) in the expression of NOGO-A, other factors had similar concentrations in both cell types (LP and BO) with a ($P > 0.05$). Finally, as the analyte TEG3 NOGO-A had a concentration of 3.35 ug / mL and other factors presented very low concentrations. From the above it is concluded that the empowerment of NT-3 as stimulating factor and the modulation of NOGO-A inhibitor factor, in OECs obtained from neonatal lamina propria, would be ideal therapeutic targets in experimental models of neuroregeneration.

Key words: Olfactory Ensheathing Cells (OECs), Neuroregeneration, Acid Fibroblast Growth Factor (aFGF), Neurotrophin 3 (NT-3), Neurotrophin 4 (NT-4), Myelin-associated protein present in the endoplasmic reticulum (NOGO-A), myelin-associated Glycoprotein and Surface Plasmon Resonance (SPR).

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de gráficas	XIII
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVII
Introducción	1
Objetivos	2
Objetivo general.....	2
Objetivos específicos	2
1. Marco teórico	3
1.1. Células de la glía envolvente olfatoria (CGEO)	4
1.1.1. El efecto promotor en neuroregeneración.....	6
1.1.2 Efecto inhibitor en neuroregeneración	7
1.2. Nanotecnología: biosensores.....	8
1.2.1. Transductor	10
1.2.2. Biosensor óptico.....	11
1.2.2.1. Resonancia de plasmones superficiales (SPR)	12
1.2.3. Chip de Inmovilización CM5	15
1.2.4. Software de análisis	16
2. Materiales y métodos	17
2.1 Materiales	17
2.2. Metodología	20
2.2.1 Cultivos CGEO.....	21
2.2.2 Preparación de las muestras para cuantificación de proteínas en medios de cultivo	23
2.3 Consideraciones éticas.....	33
3. Resultados	35
3.1. Cultivo celulares CGEO primarios.....	35
3.1.1. Determinación fenotípica de las células CGEO primarios. Citometría de Flujo37	
3.2. Cultivos celulares de líneas TEG3 (CGEO transfectadas)	38

3.2.1. Determinación fenotípica de líneas TEG3 (CGEO transfectadas). Citometría de Flujo.....	38
3.3. Resultados de cuantificación	39
3.3.3. Ensayo de unión de proteínas recombinantes.....	46
3.4. Cuantificación de los medios condicionados de CGEO	49
3.5. Células como analito- Cultivos primarios de CGEO	54
3.6. Células como analito- Cultivos de CGEO transfectadas– TEG3	58
3.7. Validación de la metodología prueba ELISA.....	60
4. Discusión.....	63
5. Conclusiones y recomendaciones	77
5.1 Conclusiones.....	77
5.2 Recomendaciones.....	78
Anexos:.....	79
Anexo 1 Grupos homogéneos de promedios para aFGF en cultivos de CGEO	79
Anexo 2 Grupos homogéneos de promedios para NT3 en cultivos CGEO	80
Anexo 3 Grupos homogéneos de promedios para NT4 en cultivos de CGEO	81
Anexo 4 Grupos homogéneos de promedios para NOGO-A en cultivos de CGEO	82
Anexo 5 Grupos homogéneos de promedios para MAG en cultivos de CGEO	83
Anexo 6 Estadística descriptiva para la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) en cultivos de células CGEO	84
Bibliografía	85

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1 Esquema básico de funcionamiento de un biosensor	9
Figura 2 Fenómeno de resonancia del plasmón de superficie	12
Figura 3 Análisis de la interacción antígeno anticuerpo sobre el chips CM5	15
Figura 4 Pasos para el ensayo de preconcentración	24
Figura 5 Pasos para la activación de la matriz e inmovilización de los anticuerpos anti-factor	25
Figura 6 Pasos de inmovilización. Parámetros para cada proteínas recombinante	26
Figura 7 Curvas de calibración para cada proteína recombinante humano.	27
Figura 8 Soluciones de regeneración	29
Figura 9 Cultivos primarios de CGEO de LP y BO	36
Figura 10 Citometría de flujo, análisis de datos de cultivos primarios de LP y BO provenientes de CGEO	37
Figura 11 Cultivo células transfectadas de las CGEO- TEG3	38
Figura 12 Citometría de células transfectadas de las CGEO- TEG	39

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 1 Ensayo de preconcentración del anticuerpo anti- aFGF	41
Gráfica 2 Ensayo de preconcentración del anticuerpo anti NT-	41
Gráfica 3 Ensayo de preconcentración del anticuerpo anti NT-	42
Gráfica 4 Ensayo de preconcentración del anticuerpo anti NOGO-	42
Gráfica 5 Ensayo de preconcentración del anticuerpo anti MAG	43
Gráfica 6 Inmovilización del anticuerpo anti- aFGF	44
Gráfica 7 Inmovilización del anticuerpo anti- NT-	44
Gráfica 8 Inmovilización del anticuerpo anti- NT-	45
Gráfica 9 Inmovilización del anticuerpo anti- NOGO	45
Gráfica 10 Inmovilización del anticuerpo anti-MAG	46
Gráfica 11 Curva estándar para la cuantificación de la proteína recombinante aFGF..	47
Gráfica 12 urva estándar. Cuantificación de la proteína recombinante NT-3	47
Gráfica 13 Curva estándar. Cuantificación de la proteína recombinante NT-4	48
Gráfica 14 Curva estándar. Cuantificación de la proteína recombinante NOGO-A...	48
Gráfica 15 Curva estándar. Cuantificación de la proteína recombinante MAG	49
Gráfica 16 Cuantificación de la proteína aFGF en medios de cultivo	50
Gráfica 17 Cuantificación de la proteína NT-3 en medios de cultivo.	51
Gráfica 18 Cuantificación de la proteína NT-4 en medios de cultivo .	51
Gráfica 19 Cuantificación de la proteína NOGO-A en medios de cultivo.	52
Gráfica 20 Cuantificación de la proteína MAG en medios de cultivos	52
Gráfica 21 Optimización de la cuantificación de las células CGEO como analito. A. Cuantificación de NT-3 en las células de LP como analito a diferentes concentraciones celulares, PBS, y DMEN. B. Cuantificación de NT-3 en las células de BO como analito	55
Gráfica 22 Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de aFGF	55
Gráfica 23 Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de NT-3	56
Gráfica 24 Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de NT-4	56
Gráfica 25 Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de NOGO	57

Gráfica 26 Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de MAG	57
Gráfica 27 Cuantificación de NT-4 en CGEO transfectadas TEG3	59
Gráfica 28 Cuantificación de aFGF, NT-3, NT-4, NOGO-A y MAG en CGEO transfectadas TEG3 como analito	59
Gráfica 29 Ensayo ELISA. NOGO-A y NT-	61

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Criterios de clasificación de los Biosensores. Cuadro Tomado de: (Apodaca, 2006).	10
Tabla 2. Materiales e Instrumentación quirúrgica.	17
Tabla 3. Reactivos utilizados en cultivos primarios de CGEO	18
Tabla 4. Reactivos de ensayo de cuantificación con el Biosensor.	19
Tabla 5. Equipos utilizados.	20
Tabla 6. Tomada de: (Andersson et al., 1999). Soluciones utilizadas para preparar los ensayos de regeneración.	28
Tabla 7. Placas lectura método ELISA para las proteínas facilitadora NT-3 e inhibidora NOGO-A	33
Tabla 8. Concentraciones y pH del buffer óptimos para cada anticuerpo utilizado.	40
Tabla 9. Días y valores más altos de la cuantificación de proteínas facilitadoras e inhibidoras presentes en medios condicionados de las CGEO.	53
Tabla 10. Niveles de significancia (p) de la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) en los medios de cultivos de CGEO.	53
Tabla 11. Estadística descriptiva y niveles de significancia (p) de la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) en CGEO.	58
Tabla 12. Concentraciones de cada factor (aFGF, NT-3, NT-4, NOGO-A y MAG) en los medios de cultivo de las CGEO, las CGEO de cultivos primarios y la línea celular TEG3 como analito.	60

Lista de Símbolos y abreviaturas

aFGF =aFGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos ácido
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BO	Bulbo olfatorio
CGEO	Células de la glía envolvente olfatoria
CDH2	Molécula de matriz extracelular
CNPASA	Marcador de células formadoras de mielina
CS	Células de Schwann
Cy3	<i>Cyanine Dye 3</i>
CX3CL1	Ligando 1 de Quimoquina (<i>C-X3-C Motif</i>)
DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco modificado
DRG	Ganglio de la raíz de nervio dorsal
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDC	Dimetilaminopropil carbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EO	Epitelio olfatorio
E-NCAM	Molécula de adhesión celular neuronal embrionaria
FB	Fast Blue
FIA	Fluoroimmunoanálisis
FG	Goma de fibrina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GBC	Células basales globosas
GBH	Células basales horizontales
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales
GFAP	Proteína acida fibrilar glial
GNF	Factor neurotrófico glial
GP	Glicoproteína de membrana
GMF	fibroblastos genéticamente modificados
HBC	Células basales horizontales
HBS-EB	Buffer
ICLAS	<i>International Council for laboratory Animal Science</i>
IGF	Factor de crecimiento parecido a la insulina
IL	Interleuquina

IL-6	Interleuquina 6
IL-R	Receptor de Interleuquina
ILAR	Internacional laboratory animal research
L1CAM	Molécula de la matriz extracelular
Lingo-1	proteína que está codificada por el LINGO1 gen
LP	Lámina propia
L1	Laminina 1
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MAIs	Inhibidores asociados a mielina
MC	Medio de cultivo
MO	Mucosa olfatoria
NCAM1	Molécula de matriz extracelular 1
ng	Nanogramos
NHS	<i>N</i> hidroxisuccinimida
NGF	Factor de crecimiento de nervios
NOGO-A	Proteína transmembranal
NgR	Receptor de Nogo
MSC	Células Mesenquimales
NT	Neurotrofinas
NT-3	Neurotrofina- 3
NT-4	Neurotrofina- 4
OD	Densidad óptica
PBS	Solución Salina amortiguada por fosfatos
POES	Procedimientos Operativos Estandarizados
P75^{NTR}	Receptor de Neurotrofina
pg	Picogramos
PIM	Polímero molecular impreso
PNA	Poliacrilonitrilo
RIA	Radioinmunoensayo
RTN1,2,3,4	Reticulon 1 , 2,3 y 4
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SERPINE1	<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1)</i>
SFB	Suero fetal bovino
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial
S100B	Proteína asociada a calcio
TEG3	Línea celular transfectadas de la glía envolvente olfatoria
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa

Troy	Es un factor neurotrófico tumoral , receptor de membrana para p75 ^{NTR}
trkB	Tirosin Kinasa B
trkC	Tirosin Kinasa C
UR	Unidades de resonancia
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

Introducción

Estudios recientes han evaluado, en modelos *in vivo* e *in vitro*, las diferencias biológicas de la CGEO tomadas de diferentes tejidos olfatorios y usadas en modelos animales con lesión medular, mostrando cambios en el grupo que utilizaron células de la lámina propia (Kubasak et al.) y BO con una disminución en el tamaño de la cavidad de la lesión en la médula espinal (Richter et al., 2005). Simultáneamente, a nivel molecular se han observado la expresión de diferentes proteínas que se utilizan como marcadores gliales en la CGEO de la LP, como del BO *in vitro*. Por ejemplo; en LP como en la capa externa del BO las CGEO son positivas para P75^{NTR} (receptor de Neurotrofinas) S100 β (Proteína asociada a calcio) y GFAP (proteína acida fibrilar glial) (Richter et al., 2005). Con respecto a los factores proteicos solubles inhibidores como glicoproteínas asociadas a la mielina MAG entre ellas NOGO; que forma parte de la familia proteica que está asociada a mielina codificada por el gen RTN4 (*reticulon family*) con mayor efecto inhibidor sobre el sistema nervioso y ligadas al retículo endoplasmático (Chen et al., 2000). En cuanto NOGO-A, está involucrada en la secreción neuroendocrina y en el transporte transmembranal en las células del sistema neuroendocrino. Esta proteína se localiza en la materia blanca del SNC, concretamente en la superficie de los oligodendrocitos y en el “*loop*” interno de la mielina fue descrita en 1994 como inhibidor del crecimiento axonal que impacta en la neuroregeneración (Domeniconi et al., 2002).

Para entender los mecanismos asociados a los procesos de neuroregeneración, se hace necesario poder detectar y cuantificar las proteínas presentes en cultivos celulares de las CGEO ya que aún no se encuentran estudios de cuantificación de estos factores proteicos en células de este tipo en tiempo real. Por otro lado, ensayos experimentales de interacción molecular en tiempo real como cuantificación, relación estructura-actividad, unión a ligando, entre otros, han utilizado muestras con diferentes biomoléculas sin pretratamiento, sin el uso de marcadores y reveladores. Así mismo, el análisis simultáneo de varios marcadores biológicos utilizando una

misma superficie de detección por medio del uso de agentes de regeneración química permite resultados más rápidos y a bajo costo. Por lo anterior, esta investigación plantea el uso de biosensores como dispositivos que permiten evaluar parámetros biológicos o químicos que combinan dos componentes, uno de carácter biológico tales como (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos) y otro de carácter físico (transductor). Es así como, las medidas de concentración de los factores proteicos objeto de este estudio, se conocen en tiempo real con un mínimo de muestra que facilitan eficazmente evaluar cuantitativamente la presencia y expresión de factores promotores e inhibidores solubles de neuroregeneración en las CGEO. Adicionalmente, se hizo una evaluación cuantitativa de los factores expresados por las CGEO vivas y las TEG3 dentro del sistema biosensor utilizados como analito, estudiando así los resultados obtenidos de la concentración de los factores producidos por las células mencionadas. Por ejemplo, en el área de cuantificación de biomarcadores; el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) se ha evaluado en células de carcinoma (Liu et al., 2012). Además, en medios de cultivo se ha visto como la interleuquina 6 (IL-6) está relacionada con procesos de inflamación (Chou et al., 2010). Dichas mediciones se han realizado en escala manométrica, utilizando bajos volúmenes de muestra proporcionando una alta sensibilidad y especificidad.

No obstante, no se ha evaluado en forma cuantitativa, la concentración de estos factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración en medios de cultivo de CGEO y sus medios condicionados por medio de biosensores. Por lo tanto, para lograr una aproximación del mecanismo de neuroregeneración se requiere como primer paso la detección y cuantificación de las proteínas previamente mencionadas presentes en dichos cultivos (*in vitro*) así como la evaluación de la expresión de biomarcadores directamente sobre las CGEO y TEG3 (*in vivo*). Así mismo, el análisis e interacción de proteínas por medio del uso de biosensores, ha venido siendo desarrollado por primera vez en el país con trabajos de investigación en la evaluación de biomarcadores en procesos de regeneración de heridas (Bustos et al., 2014). Es así como, este trabajo pretende lograr una aproximación de la presencia y concentraciones de los factores proteicos anteriormente mencionadas en cultivos de CGEO en sus medios condicionados y en la línea celular TEG3 utilizando un tipo de tecnología innovadora, evaluando la presencia y expresión de factores estimuladores aFGF, NT-3 y NT-4 e inhibidores

NOGO-A y MAG de neuroregeneración presentes en células de CGEO y sus medios condicionados, lo cual podría contribuir al mejoramiento en los procesos neuroregenerativos en enfermedades del sistema nervioso.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la presencia y expresión de factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración presentes en cultivos de CGEO y sus medios condicionados.

Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología de cuantificación de factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidor (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración presentes en cultivos de CGEO y sus medios condicionados por medio de nanotecnología (Biosensor).
- Analizar y evaluar los factores estimuladores e inhibidores de las CGEO con el uso del biosensor.
- Validar la metodología de cuantificación del biosensor mediante la aplicación del método de ELISA.

1. Marco teórico

Los capítulos son las principales divisiones del documento. En estos, se desarrolla el tema del documento. Cada capítulo debe corresponder a uno de los temas o aspectos tratados en el documento y por tanto debe llevar un título que indique el contenido del capítulo.

La recuperación funcional en lesiones medulares ha sido evaluada con diferentes estrategias terapéuticas tales como: trasplante de células nerviosas (mayor aplicación), implante de factores neurotróficos y una combinación de implante de células nerviosas y factores neurotróficos (Ramon-Cueto and Avila, 1998). Sin embargo, la confiabilidad de las células para trasplantar ha sido un reto científico y ético ya que las mismas deben expresar características tales como la plasticidad obtenida de tejidos fetales o la capacidad natural de soportar la regeneración axonal como la CGEO. (Chou et al., 2014)

Estudios han reportado resultados prometedores en modelos animales de lesión medular de distinta severidad utilizando diferentes líneas celulares como, células de Schwann (CS) (Cheng et al., 1996), células neuronales (Lee et al., 2006), células mesenquimales (MSC) (Zurita and Vaquero, 2006) y fibroblastos genéticamente modificados (GMF) (Grill et al., 1997). Además, de las características anteriormente mencionadas se debe tener en cuenta que una vez que las células están listas para trasplantar, se debe obtener confluencia de las mismas en los cultivos, viabilidad y que logren producir y extender fibras, en ocasiones por largas distancias con el fin de alcanzar y restablecer los circuitos dañados (Ziemba et al., 2008).

Por otro lado, la literatura reporta estudios evaluando, en modelos *in vivo* e *in vitro* las diferencias biológicas de la CGEO tomadas de diferentes tejidos olfatorios y usadas en modelos animales con lesión medular, mostrando cambios en el grupo que utilizaron células de la LP y BO con una disminución en el tamaño de la cavidad de la lesión en la médula espinal (Richter et al., 2005). A nivel molecular, se ha observado la expresión de

diferentes proteínas que se utilizan como marcadores gliales en la CGEO de la LP, como del BO *in vitro*. Por ejemplo, en la LP como en la capa externa del BO las CGEO son positivas para P75^{NTR} (receptor de neurotrofinas) S100 β (proteína asociada a calcio) y GFAP (proteína acida fibrilar glial) (Richter et al., 2005). Es así como, el interés científico en el área de neuroregeneración se ha enfocado en las CGEO ya que son estimuladoras de la regeneración del SNC debido a su inherente capacidad en el sistema olfatorio de apoyar la continua regeneración de neuronas olfatorias (Barnett and Riddell, 2004).

1.1. Células de la glía envolvente olfatoria (CGEO)

Las CGEO son un tipo de macroglía y únicamente se encuentran en el sistema olfatorio; en los nervios olfatorios, la LP y el BO. Estas células comparten varias características con los astrocitos, las CS, y la glía entérica pero son consideradas un tipo único y distinto de glía. Las CGEO son un tipo especializado de glía, que envuelven los axones olfatorios desde la LP cruzando el sistema nervioso periférico (SNP) y el SNC hasta el BO (Boe et al., 1991; Gómez et al., 2007; Ramon-Cueto, 2011). Su desarrollo embriológico evidencia dos orígenes ectodérmicos distintos: las plácodas olfatorias (Imaizumi et al., 1998; Ramon-Cueto et al., 1998; Imaizumi et al., 2000b) que aparecen en la región rostro-lateral de la cabeza embrionaria y el bulbo olfatorio, que se origina del manto del prosencéfalo (Doucette, 1990, 1996).

El epitelio olfatorio (EO) está formado por dos tipos de células madre neurales, las células basales globosas (CBG) y las células basales horizontales (CBH) las primeras son la principal fuente para la neurogénesis guiando desde el nacimiento las neuronas y otras poblaciones celulares como las CGEO, a diferencia del segundo tipo celular, las células basales horizontales CBH que son comúnmente inactivas pueden ser activadas para generar nuevas GBC y reconstruir la población celular del EO después de la lesión (Carter et al., 2004; Leung et al., 2007). Hasta hace algunos años se pensaba que estas células se originaban de la placa olfatoria (Doucette, 1990; Ramon-Cueto and Avila, 1998). Sin embargo, actualmente se cree que tienen un origen dual originándose en mayor medida de la cresta neural al igual que todas las células del EO (Forni et al., 2011; Katoh et al., 2011).

Adicionalmente, estas células exhiben desarrollo, morfología, receptores de membrana y propiedades funcionales que no comparten con otros tipos celulares de glía y por esto constituye un único tipo celular no clasificado dentro de cualquier población celular glial (Lakatos et al., 2003; Gomez et al., 2014; Gomez et al., 2015). Así mismo, envuelven los axones olfatorios durante el camino del EO al BO (Yan et al., 2001; Chuah and West, 2002) produciendo factores neurotróficos y neuríticos promotores para medir la supervivencia neuronal y la elongación axonal. Dentro de estos factores neurotróficos se encuentra: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de las células de la glía (GNF) y el factor de crecimiento neuronal (NGF) así como NT-3 y NT-4. (Bregman et al., 1997; Bregman et al., 2002; Au and Roskams, 2003; Chung et al., 2004; Sasaki et al., 2011).

Cabe destacar que una línea celular inmortalizada de las CGEO es una línea clonal, la TEG3; que posee un antígeno T de SV40 estable transfectadas de la CGEO de cultivos primarios de BO de ratas adultas. Con esta línea celular en modelos experimentales con lesión medular a nivel de C3 se realizó un estudio con el fin de evaluar la capacidad de las células TEG3 para promover la reparación en el SNC lesionado. Observándose que esta línea clonal inmortalizada retiene la capacidad para promover la regeneración axonal (Goodman et al., 1993; Boruch et al., 2001; Moreno-Flores et al., 2002), mostrando que mantienen las propiedades de un cultivo primario de CGEO con respecto a la regeneración axonal, neuritogénesis, expresando que la línea TEG3 es la que mejor conserva dichas propiedades (Moreno-Flores et al., 2003a, b), y que pueden sobrevivir en la médula espinal lesionada durante al menos 10 semanas después del trasplante. Además, se pueden integrar en los sitios de lesión y adoptar morfologías similares a los encontrados en los cultivos primarios, sin la formación de tumores. Indicando que las células TEG3 pueden promover la reparación del axón de las vías sensoriales y motoras en la columna dorsal de la médula espinal, lo que permite la recuperación de la función motora y sensorial. Por lo tanto, esta línea clonal de CGEO inmortalizada derivada de una sola célula es capaz de promover la recuperación de la médula espinal lesionada (Moreno-Flores et al., 2003a; Moreno-Flores et al., 2006).

Las CGEO presentan propiedad remielinizante de manera directa a través de la producción de mielina (Boyd et al., 2005) o de forma indirecta por la inducción de la proliferación de los oligodendrocitos (Masgutova et al., 2010). Estudios en 1992 y 1995

realizados por Devon y Col, mostraron como las CGEO fetales al igual que las CS pueden sintetizar mielina (Devon and Doucette, 1992). Años después en el 2011 Radtke y col, observaron que estas células en cultivo tienen la capacidad de expresar CNPasa, un marcador de células formadoras de mielina, tanto en la membrana como en microtúbulos, confirmando que estas células tienen la capacidad intrínseca de producir mielina (Radtke et al., 2011).

Por otro lado, un aspecto importante para la regeneración axonal es la cicatriz glial, tomando en cuenta que dicha regeneración se da en un ambiente con factores promotores e inhibidores con predominio de factores promotores en las mismas. Estudios de Lu y colaboradores, demostraron como independientemente de la formación de la cicatriz glial, pasados tres meses de la lesión medular, al implantar CGEO la producción de factores estimuladores de regeneración en el sitio de la lesión puede hacer innecesaria la remoción de la cicatriz glial, ya que allí se produce un balance positivo de factores estimuladores, que disminuye la tendencia inhibitoria e induce la regeneración axonal. Estos autores proponen que las CGEO, al igual que las CS que migran desde la raíces dorsales de los nervios espinales, también podrían ser una fuente de estos factores *in vivo* (Lu et al., 2015).

1.1.1. El efecto promotor en neuroregeneración

El efecto promotor de factores neurotróficos ha sido estudiado en ratas adultas con hemisección de la médula espinal, donde se observó que BDNF, NT-3, NT-4 son responsables de la regulación del crecimiento y mantenimiento de proyecciones axonales en un trasplante de tejidos de la médula espinal fetal (Bregman et al., 1997). Otros estudios (Cheng et al., 2002; Chung et al., 2004), sugiere que la acción de NT-3 está asociada con una respuesta inmune que se desencadena después de una lesión en la médula espinal, tomando en cuenta que se evaluó la presencia de dicha proteína en médula con y sin lesión a nivel lumbar, se encontró que no tiene ningún efecto sobre la médula espinal en procesos crónicos o degenerativos a diferencia de la médula lesionada. Roskams y colaboradores en 1996, demostraron que las CGEO cultivadas producen NT-3, estableciendo diferencias en la expresión del gen de NT-3 con diferentes concentraciones de suero. Adicionalmente, otros autores han reportado que otras neurotrofinas, como las neurotrofinas 3 y 4 (NT-3, NT-4) también están presentes en

epitelio olfatorio y están relacionadas con regeneración axonal (*Boruch et al, 2001*), observando que las células cultivadas sin suero producían menos NT-3 que cuando se cultivaban con concentraciones altas de suero entre un 15-20% (Lu et al., 2015) mostrando influencia y relación en el proceso de regeneración axonal (*Boruch et al, 2001*).

1.1.2 Efecto inhibitor en neuroregeneración

El efecto inhibitor está dado por proteínas como Nogo-A (Freund et al., 2006) que han sido encontradas como potentes inhibidores sobre el crecimiento neuronal *in vitro* (Nyatia and Lang, 2007; Su et al., 2007) y forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresándose ampliamente durante el desarrollo embrionario y jugando un papel importante en el desarrollo axonal (Pineau et al., 2010; Cho et al., 2012) y por la proteína MAG que es una molécula bifuncional, cuyo efecto en el crecimiento neurítico depende del tipo celular con el que contacta y de la edad de dichas células. Por ejemplo, en neuronas neonatales de DRG (Ganglio de la raíz dorsal) promueve el crecimiento neurítico, mientras que en estadios adultos inhibe su crecimiento (Cao et al., 2010). La caracterización morfológica y biomolecular de estas células y de su expresión de proteínas han sido evaluadas con diferentes metodologías de análisis como microscopía electrónica, inmunohistoquímica y microscopía confocal y RT-PCR (expresión de biomarcadores) (Chung et al., 2004). En cuanto a la cuantificación de otras proteínas como neurotrofinas, estas han sido evaluadas por ELISA (Mandel et al., 2011). Por otra parte ha sido estudiado el papel inhibitorio de estas proteínas después de la lesión medular, mostrando como dichas moléculas bloquean la regeneración axonal por medio de su acción a través de un receptor común: el complejo receptor Nogo. Este receptor de membrana está formado por la proteína *GPI NgR1* y tres correceptores putativos (p75^{NTR}, Troy y Lingo-1) (Su Z, 2007; Chuah MI, 2011; J, 2014).

Diversos estudios han demostrado que las CGEO tienen la capacidad de promover regeneración axonal (Li et al., 1997; Ramon-Cueto et al., 2000; Richter et al., 2005; Gorrie et al., 2010; Li et al., 2011; Lu et al., 2015) y a su vez remielinización de axones dañados (Imaizumi et al., 1998; Imaizumi et al., 2000a; Radtke et al., 2004; Sasaki et al., 2007; Esmaili et al., 2014). Sin embargo, dichos mecanismos por los cuales se logran dichos efectos no están del todo claros. Existen descritas dos vías principales por las

cuales se puede restablecer la conexión neuronal; en la primera vía existe una regeneración de axones dañados y en la segunda hay una formación de vías de reconexión (Deumens et al., 2005; Pellitteri et al., 2009; Sandvig et al., 2012).

Los mecanismos directos hace referencia a que las CGEO pueden actuar como sustrato físico para el crecimiento de neuritas; se ha demostrado que el crecimiento de las mismas se promueve más efectivamente cuando las CGEO están en estrecho contacto con las neuronas (Chung et al., 2004; Pellitteri et al., 2009). Adicionalmente, Li y cols., reportaron que las CGEO ejercen un efecto de puente entre ellas mismas y con los axones regenerados en la raíz dorsal de la médula espinal (Li et al., 2007). Por otro lado, los mecanismos indirectos tienen que ver con la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas y con la activación de otras células gliales y de CS (Au et al., 2007).

1.2. Nanotecnología: biosensores

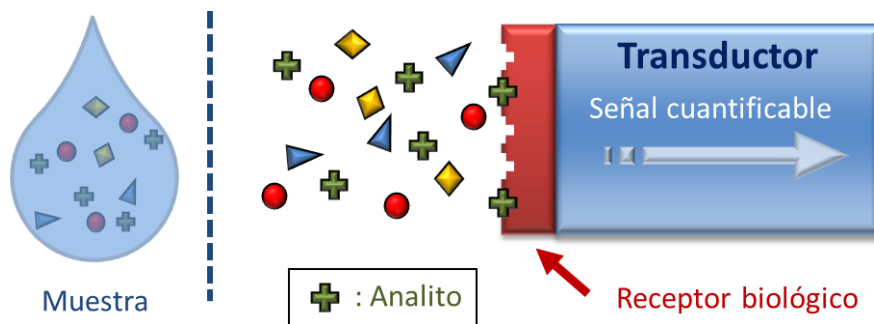
Los biosensores son dispositivos que reconoce interacciones moleculares mediante la unión específica de analitos (componente biológico) a través de un componente fisicoquímico que actúa como transductor de las señales, determinando la concentración o actividad de especies bioquímicas en una muestra (*Reyes and Cavalieri, 2003*). Por todo lo anterior, un biosensor no es más que un dispositivo capaz de transformar una variable física o química en una señal medible y tangible por nuestros sentidos (*Regatos, 2012*). Permitiendo, sensar moléculas biológicas dentro de modelos biológicos en tiempo real, a baja concentración utilizando sistemas físicos ópticos, electroquímicos, acústicos y nanomecánicos.

Las características más destacables de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas, son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo costo, entre otras (*Apodaca, 2006*).

La figura 1. Muestra cómo funcionan los biosensores; la muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar el analito (la sustancia a determinar) para el cual está diseñado el receptor biológico. Cuando tiene lugar la reacción de

reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, produciendo este último una señal cuantificable proporcional a la concentración del analito detectado (Gómez, 2013).

Figura 1. Esquema básico de funcionamiento de un biosensor. Tomado de: (Gómez, 2013).



La clasificación de los Biosensores varía dependiendo del tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito; el método utilizado para detectar dicha interacción; la naturaleza del elemento de reconocimiento; o del sistema de transducción. (González and García, 2005). Dentro de estos biosensores, se encuentran los de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) que han tenido una gran utilización en campos biotecnológico, farmacológico, de alimentos, entre otros (Thillaivinayagalingam et al., 2007; Rich and Myszka, 2010; Thillaivinayagalingam et al., 2010). Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de clasificación de los Biosensores. Cuadro Tomado de: (Apodaca, 2006).

Criterios de clasificación	
Mecanismo de interacción	Catalítico y por afinidad.
Metodología de detección	Directa e Indirecta.
Sistema de reconocimiento	Enzima. Orgánulo, tejido o célula. Receptor biológico Anticuerpo. Ácidos nucleicos. *PIM, *PNA, háptamero.
Sistema de transducción	Electroquímico. Óptico. Piezoeléctrico. Termométrico. Magnético. Nanomecánicos.

*PIM y PNA: elementos de reconocimiento biomimético.

1.2.1. Transductor

Los transductores son dispositivos que convierten la información correspondiente a las variaciones de las propiedades fisicoquímicas, inducidas como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, en magnitudes eléctricas cuantificables. Esta transformación permite que las señales puedan ser amplificadas, almacenadas y registradas (Apodaca, 2006).

Existen varios tipos de transductores que pueden emplearse en la fabricación de biosensores, como transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos (máscicos, gravimétricos, acústicos), termométricos, magnéticos y nanomecánicos. La utilización de

un transductor u otro, dependerá del propio elemento de reconocimiento empleado, de la naturaleza de la interacción entre éste y el analito y del mecanismo de señalización producido por el marcador utilizado si lo hubiere.

Dentro de la clasificación de los transductores se encuentran los transductores ópticos, estos se basan en la medición de las variaciones que se producen en las propiedades de una radiación electromagnética, como efecto de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento del biosensor. Dicha interacción puede inducir cambios en las características de absorción, emisión, dispersión, polarización, refracción o reflexión de la radiación, cuando ésta incide sobre la superficie donde se encuentra el elemento de reconocimiento. Se utilizan tanto métodos de detección directa como métodos de detección indirecta, en la que es necesario utilizar marcadores, adaptándose igualmente a sistemas biocatalíticos como de bioafinidad. Entre los transductores que utilizan propiedades ópticas se incluyen los sensores de fibra óptica (optrodos) y los sensores de onda evanescente. Varios son los biosensores que se basan en este principio de transducción, como los sensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) (Thevenot et al., 2001).

1.2.2. Biosensor óptico

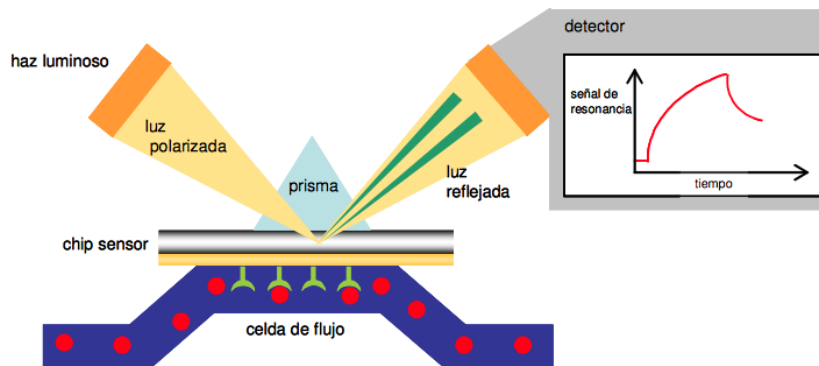
Son oscilaciones colectivas que involucran al campo electromagnético y a los electrones de la banda de conducción de un metal. Se produce cuando un haz de luz polarizada, procedente de un medio de mayor índice de refracción (prisma), incide sobre la superficie de una capa metálica delgada (oro o plata) sobre la cual se encuentra depositada la muestra, denominado ángulo de resonancia. Posteriormente, se producirá la excitación de los plasmones del metal, registrándose la correspondiente pérdida de potencia del haz reflejado. Este ángulo de resonancia es poderosamente dependiente del índice de refracción del medio adyacente a la lámina metálica. Las variaciones que se produzcan en el índice de refracción del mismo serán registradas como desplazamientos en el ángulo de resonancia y a su vez relacionados con las variaciones de masa producidas en la superficie sensora. La interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, podrá cuantificarse directamente sin necesidad de recurrir al empleo de marcadores ni de reactivos adicionales (Sasaki et al., 1998; López et al., 1999).

1.2.2.1. Resonancia de plasmones superficiales (SPR)

La introducción a principios de los años 90 de una nueva tecnología basada en el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie del inglés (*surface plasmon resonance*) ha permitido la visualización en tiempo real del proceso de interacción entre biomoléculas (Pérez Escoda, 2007).

Uno de los tipos de transducción óptica de Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR) es el *Biacore*[®], el cual identifica las interacciones moleculares en tiempo real, utilizando una tecnología no invasiva que responde a los cambios en la concentración de moléculas en superficie del sensor. El principio de detección es sensible a cambios en el índice de refracción dentro de aproximadamente 150 nm desde la superficie del sensor. En el biosensor óptico, se pueden utilizar para estudiar las interacciones que implican en principio cualquier tipo de molécula, de candidatos a fármacos orgánicos a proteínas, ácidos nucleicos, glicoproteínas e incluso virus y células enteras. El principio de detección no requiere ninguno marcador, y las mediciones se pueden realizar en mezclas complejas tales como sobrenadantes de cultivo celular o extractos celulares. La identificación de la interacción en una matriz es determinada por la especificidad de interacción en la superficie. El biosensor SPR tiene cuatro aspectos importantes que permiten su funcionamiento, un chip de inmovilización, un sistema de microfluído, un transductor y un software de análisis.

Figura 2. Muestra el fenómeno de resonancia del plasmón de superficie. La resonancia del plasmón de superficie se produce por una reflexión total del haz de luz incidente al interactuar con los plasmones por lo que se observa una reducción de la intensidad de la luz reflejada. Imagen tomada de (Pérez Escoda, 2007).



El uso de biosensores ópticos SPR presenta algunas ventajas a diferencia de otras técnicas utilizadas para detección y cuantificación de proteínas como ELISA, FIA, RIA los cuales son tradicionalmente usados para procesos de desarrollo y control de calidad de productos biofarmacéuticos (Schwab, 2002). Este tipo de tecnología no requiere reportar moléculas como enzimas/substratos, fluorocromos o radioisótopos (Thillaivinayagalingam et al., 2007; Chou et al., 2014). Así mismo, permite el análisis de muestras en concentraciones a nivel de nanogramos (ng) y picogramos (pg) haciendo de esta una metodología por excelencia para la evaluación de interacciones moleculares con una alta sensibilidad y selectividad.

1.2.2.2. El ciclo experimental del SPR Biacore®

- **Inmovilización**

Es la unión del ligando (covalente) a la superficie del chip sensor CM5. Existen diversos métodos de inmovilización como: adsorción, atrapamiento, unión enlaces covalentes, inclusión en bicapa lipídica, entre otros (Apodaca, 2006). No se hace necesario, modificar previamente el ligando, tomando en cuenta que el nivel de inmovilización es fácil de controlar y el consumo de la molécula a unir es bajo. El proceso de acoplamiento básico se da entre los grupos aminos y tioles del ligando y de la superficie de inmovilización (-NH₂, -SH, -COH), normalmente termina en una orientación aleatoria del ligando. (Carreño, 2011).

Para esta fase se debe tener en cuenta:

1. Preparación de la muestra, seleccionando el ligando con el grado de pureza adecuado.
2. Escoger el procedimiento de inmovilización basado en el ligando.
3. Realizar el análisis de pre-concentración con el fin de establecer el buffer con el pH óptimo para la inmovilización.

- **Asociación**

Es la unión de la molecular analizada con el ligando. La asociación es la primera fase del ciclo experimental de interacción biomolecular. La unión se produce cuando el analito y el ligando interaccionan debido a la difusión, y cuando la unión tiene la orientación correcta

y suficiente energía. La tasa de asociación; es el número de eventos de unión por unidad de tiempo (Graphpad, 1998; GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2012).

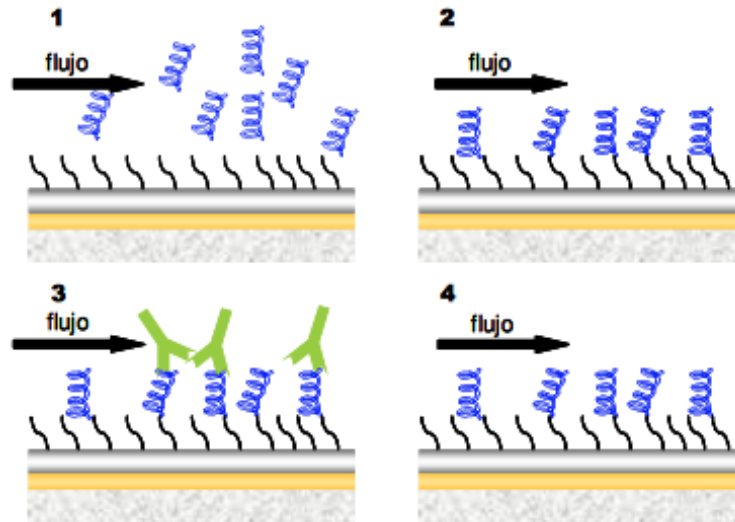
- **Disociación**

Hace referencia a la separación del analito con el ligando. Cuando el analito no se ha unido a la superficie del chip se sustituye por el tampón de flujo, la concentración libre del analito comienza a disminuir a cero y el complejo comenzará a disociarse. La velocidad de disociación; es igual al número de eventos de la disociación por unidad de tiempo. Posteriormente, el ligando y el analito quedan con sus enlaces terminales libres (Graphpad, 1998; GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2012).

- **Regeneración**

Es la disociación forzada del analito con el fin de reutilizar la superficie del chip sensor. El analito debe ser retirado, pero el ligando debe permanecer intacto a las condiciones de regeneración y no causando un daño irreversible al ligando (Andersson et al., 1999). Para esta fase normalmente se utiliza glicina mM con un pH 1.5 - 2,5 tomando en cuenta que la mayoría de las proteínas en su configuración primaria y secundaria presentan carga positiva a pH bajo (Andersson et al., 1999). Por otra lado, también se puede utilizar soluciones con pH alto, productos químicos específicos para romper la interacción o con alto contenido de sal. Se debe realizar la adecuada regeneración tomando en cuenta las condiciones más suaves de la misma que se disocian completamente en el complejo. Además, otras moléculas pueden ser añadidos tales como anticuerpos, ligando y análogos de ligando que se unen al analito para disminuir reconsolidación del analito durante la disociación (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2012). Finalmente, los resultados obtenidos en el sensograma son analizados. Los procesos previamente descritos se observan en la figura 3.

Figura 3. Análisis de la interacción antígeno anticuerpo sobre el chip CM5. Inyección del factor analizar 1. Formación de un enlace covalente con la superficie, 2. Se inyecta la muestra que contiene los anticuerpos, 3. Se analiza el cambio en la señal de resonancia. Finalmente se lava la superficie para eliminar los anticuerpos, permaneciendo la proteína unida, 4. La superficie está preparada para un nuevo ensayo. Tomado de (Pérez Escoda, 2007)



1.2.3. Chip de Inmovilización CM5

Se utiliza para analizar interacciones de biomoléculas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Permite obtener datos para el estudio cuantitativo de interacciones cinéticas, afinidad, concentración y relaciones vinculantes de los reactivos. El chip está compuesto por una lámina de vidrio cubierta por una delgada película de oro la cual se une covalentemente a una matriz superficial de dextrano carboximetilado, y a ella se une covalentemente el ligando a través de las fracciones carboxilo del dextrano. Estos son grupos funcionales ($-NH_2$, $-SH$, $-CHO$ y $-COOH$) en el que el ligando puede ser utilizado para el acoplamiento. El chip se puede regenerar por medios químicos, establecidos previamente logrando la disociación selectiva y completa de los analitos al ligando, inmovilizados por uniones covalentes, sin afectar las propiedades físicas o químicas de la membrana.

1.2.4. Software de análisis

BIAsoftware[®] es un paquete de software independiente empleado para la presentación y evaluación de los sensogramas obtenidos a partir de los análisis realizados en el biosensor *Biacore*[®]-*Pharmacia*. El software soporta la interacción de modelos definidos por el usuario y los análisis de medidas de concentración a cualquier nivel de enlace o tasa de datos (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2012).

Finalmente, se han evaluado ciertas proteínas como factores de crecimiento en cultivos celulares de tejido conectivo artificial autólogo (Bustos et al., 2014) o factores de concentraciones conocidas de interleuquinas en medios de cultivo por medio de esta tecnología biosensora (Chou et al., 2010). Sin embargo, no se han evaluado proteínas implicadas en procesos de neuroregeneración como se realizó en la presente investigación.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron materiales y reactivos de las mejores marcas comerciales. A continuación se describe el uso dado y su respectiva casa comercial

Tabla 2. Materiales e Instrumentación quirúrgica.

MATERIALES	CASA COMERCIAL
Cajas de Petri	<i>PHOENIX BIOMEDICAL</i> ®
Cajas de 6 pozos	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Crioviales de 1.5 ml	Corning®
Eppendorff	Corning®
Guantes	INVERFARMA
Pipetas de 2 mL, 10 mL, 20mL y 50 mL	Corning®
Micropipetas de 20ul, 200 ul y 1000 ul	Corning® and Brand®
Puntas amarillas de 0-200ul	Corning®
Puntas blancas de 0-20 ul	Corning®
Puntas azules de 1000 ul	Corning®
Tapaboca	INVERFARMA
Tubos de 10 mL- FALCON	Corning®
Tubos de 50 mL- FALCON	Corning®
INSTRUMENTO QUIRÚRGICOS	REFERENCIA
Micro tijeras	Ziegler-Germany
Pinzas mosquito	Ziegler-Germany
Pinzas de Adson	Ziegler-Germany
Tijeras	Ziegler-Germany
Bisturí	Dimedda-Germany

Tabla 3. Reactivos utilizados en cultivos primarios de CGEO.

REACTIVO	REFERENCIA	METODOLOGÍA
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	SIGMA P5368; 10x concentrado	Obtención de tejidos olfatorios
Pentobarbital sódico	Euthanex®	Obtención de tejido olfatorio
Antibiótico antimicótico (100X)	GIBCO® 15240062	Purificación cultivos
L- Glutamina	SIGMA – Aldrich G3126 56-85-9; 1%	Cultivos primarios
Tripsina (10X)	SIGMA – Aldrich T- 1426 St. Louis, MO	Cultivos primarios
Medio condicionado (DMEM/F-12)	GIBCO® No. 54028 BRL, Gaithersburg, MD	Cultivos primarios
Poly-L-Lisina	SIGMA P4707; 0.1%	Cultivos primarios
Suero Fetal Bovino (SFB) (40X)	GIBCO® 16170086	Cultivos primarios
Azul tripano 0.2 %	GIBCO® 15250-061 BRL, Gaithersburg, MD	Cámara de Neubauer
<i>Mouse monoclonal [MLR2] to p75 NGF Receptor (FITC)</i>	Abcam Ab62122	Citometría de flujo
<i>Mouse monoclonal [G-A-5] to GFAP (Cy3 ®)</i>	Abcam Ab49874	Citometría de flujo
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich 472301. St. Louis, MO	Congelación celular
<i>Fast Blue</i>	Sigma–Aldrich D9805; al 2%	Descongelación celular
Pituitaria Bovina	GIBCO®, 12.3 mg/mL	Descongelación células TEG3

Todo el material utilizado en cultivos celulares fue esterilizado en autoclave a vapor ZSIMC durante 20 minutos a 1.2 Kg/cm² y 121 °C.

Tabla 4. Reactivos de ensayo de cuantificación con el Biosensor.

Nombre del Reactivo	Referencia	Metodología
<i>Mouse monoclonal [2E8] to Neurotrophin 4</i>	Ab87394-Abcam	Pre-concentración Inmovilización
<i>Mouse monoclonal to MAG</i>	Ab89780- Abcam	
<i>Mouse monoclonal [2E12] to FGF1</i>	Ab117640Abcam	
<i>Rabbit polyclonal to Neurotrophin 3</i>	Ab65804- Abcam	
<i>Rabbit polyclonal to Nogo A</i>	Ab62024 –Abcam	Regeneración (Bloqueo de sitios activos)
Etanolamina Clohidrato (HCl) 1 M pH 9.5	GE Healthcare, Uppsala, Sweden	
NHS (<i>N</i> hidroxisuccinimida) 0.1 M – EDC (dimetilaminopropil carbodiimida) , 0.4M (1:1)	GE Healthcare, Uppsala, Sweden	Reactivos de regeneración de la matriz
<i>Recombinant Human Nogo-A Fc Chimera, aa 566-758</i>	R&D Systems 3515-NG-050 ; 50 µg	Ensayos de Unión
<i>Recombinant Myelin Associated Glycoprotein</i> <i>Organism species: Homo sapiens</i>	Cloud-Clone Corp, RPA422HU01-10µg	
<i>Recombinant Human FGF acidic aa 2-155</i>	R&D Systems 231-BC-025/CF: 25 µg	
<i>Recombinant Neurotrophin 3 (NT-3)</i> <i>Organism species: Homo sapiens.</i>	Cloud-Clone Corp, RPA106Hu01;10 µg	
<i>Recombinant Neurotrophin 4 (NT-4)</i> <i>Organism species: Homo sapiens(Crowe et al.)</i>	Cloud-Clone Corp RPA107Hu01; 10 µg	
HBS-EB; 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% P20	Preparado en el laboratorio	Buffer corrida del equipo
<i>Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody - HRP</i>	Laboratorio Vector. Referencia PI-1000	Inmunoensayo ELISA
<i>TMB Micro well Peroxidase Substrate System</i>	Referencia. 50-76-03	Inmunoensayo ELISA

Tabla 5. Equipos utilizados.

Equipo	Referencia
Biacore 2000	Biacore General Electric
Baño de María	Memmert®
Cabina de Flujo laminar	Thermo Scientific
Centrifuga	Joan BR41
Citómetro de flujo	FACS AREA II - BD (Biosciences).
Chip CM5	Biacore General Electric
Computador	MacBook Pro 13.3"
Incubadora de CO ₂	Incub Safe
Lector de Placas ELISA	Dynex Technologies
Microscopio	Nikon
Micro pipetas Transferpette 5 uL, 10 uL y 20uL	Brand- Germany
Termo de Nitrógeno Líquido	111 litros - CIENYTEC
Refrigerador -20°C	L.G. USA
Refrigerador 4°C	L.G. USA
Refrigerador -80 °C	Forma Scientific Germany

2.2. Metodología

El diseño experimental utilizado para esta investigación se basó en las 3 R de Russell (reducción, refinamiento y reemplazo en el número de animales). Se realizaron cultivos primarios de CGEO, en dos etapas: i) Primero se obtuvieron de BO y LP a partir de ratas Wistar neonatales entre 10 a 13 días de nacidas, seguido de la purificación y caracterización de los cultivos mediante citometría de FACS AREA II - BD (*Biosciences*). ii) Posteriormente se realizó la identificación, cuantificación y evaluación de factores estimuladores (aFGF, NT-3, NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración expresados por las células cultivadas y liberados a los días 2, 5, 10 y 30 en los medios condicionados de cultivos de las CGEO ambos provenientes de LP y BO procesados en el biosensor de tipo óptico.

La metodología propuesta está en concordancia con cada uno de los objetivos propuestos, de la siguiente manera:

Objetivo 1. Estandarizar la metodología de cuantificación de factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración presentes en cultivos de CGEO y sus medios condicionados por medio de un biosensor.

Metodología: Con el fin de dar cumplimiento al primer objetivo se dividió en dos fases: la primera, corresponde a la realización de cultivos celulares y la segunda a la cuantificación de las proteínas promotoras e inhibidoras en el biosensor.

2.2.1 Cultivos CGEO

2.2.1.1. Obtención de tejidos olfatorios a partir de un modelo animal

Las CGEO fueron obtenidas de BO y de LP olfatoria y se extrajeron de 3 ratas macho neonatales entre 10 a 13 días de nacidas con un peso aproximado de 30 gr, las cuales fueron sacrificadas con sobredosis de 0.1mL pentobarbital sódico (Euthanex®). Se siguieron tres pasos para la obtención de tejido del BO y de la LP con el fin de mantener la esterilidad de los tejidos, con un juego estéril de tijeras y pinza con garras se retiró la cabeza del cuerpo, luego se retiró la piel de la cabeza, utilizando otro segundo juego de pinzas y tijeras. Finalmente, para obtener el BO se utilizó una micro tijera y pinzas de Adson con garra para hacer dos cortes paralelos en el cráneo desde el agujero magno hasta el hueso frontal y un tercer corte a nivel del frontal. De esta manera se forma un triángulo y se levanta la tapa de la cavidad craneana extrayendo así los bulbos olfatorios. Para la LP, se cortó el hueso nasal de lado a lado y se levantó cuidadosamente despejando la vía olfatoria, utilizando una tijera delgada exponiendo los cornetes y el septo olfatorio. Ambos tejidos BO y LP se colocaron en caja de Petri con PBS estéril (Gómez, 2009; Botero, 2015).

2.2.1.2. Purificación y cultivos celulares

Se tomó como base la técnica de Nash (Nash et al., 2001), con algunas modificaciones propias de las estandarizaciones de este protocolo (Gómez, 2009; Botero, 2015). Los tejidos obtenidos mediante cirugía, se cortaron finamente y se pasaron a tubos cónicos de 50 mL, con 1 mL de Tripsina al 1% en PBS 1X y se dejó en incubadora durante 7 min, luego se agregó 2 mL de medio de cultivo DMEM/F12, 10% de SFB, 1% de antibiótico-antimicótico y 1% de Glutamina. Posteriormente, se centrifugó durante 8 min a

1000 rpm y se obtuvo el sobrenadante resuspendiéndose nuevamente. Finalmente, se sembraron en cajas de 6 pozos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂; a las 36 horas se sembraron con Poly-L-Lisina al 1% hasta completar 30 días. Con el fin de purificar los cultivos se realizaron centrifugaciones diferenciales a través del tiempo hasta completar 120 horas y obtener confluencia celular y se mantuvieron por 30 días en incubadora de CO₂. Los medios se cambiaron cada 24 horas y los cultivos se observaron a través del microscopio invertido Nikon Eclipse TS100, tomando fotos con cámara Olympus de estos cultivos. Posteriormente, se realizó citometría de flujo y se les realizó un conteo en cámara de Neubauer con azul tripano al 0.02% para verificar viabilidad celular y conocer el número de células presentes en la muestra. Observando una concentración celular de (1.2 X10⁵ cel/ mL) en células de BO y de LP . Finalmente las células obtenidas se congelaron a -192 °C en tanque de nitrógeno CIENYTEC hasta la cuantificación dentro del sistema biosensor.

2.2.1.3 Citometría de flujo

Para establecer el porcentaje de CGEO en cada cultivo se utilizó el marcador del receptor de Neurotrofina (p75^{NTR}) específico para las CGEO (Turner and Perez-Polo, 1992; Ramon-Cueto et al., 1993). Se verificó el porcentaje de células p75^{NTR} conjugado con Isotiocianato de fluorescencia (FITC) a una concentración de 1 mg/mL y Proteína Fibrilar Ácida Glial (GFAP) conjugado con Cy3 a 1.2 mg/mL, en cultivos obtenidos de BO y de LP. Para procesar la muestra de cada cultivo se prepararon dos alícuotas de 50 µl conteniendo una densidad celular de 1x10⁵ células. Una de las alícuotas se tomó como blanco y a la otra se le adicionaron 5 µL de anticuerpo monoclonal anti p-75^{NTR} (FITC) a 1mg/mL y 5 µL anti GFAP a 1.2 mg/mL. Los anticuerpos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, y las células se resuspendieron en 200 µL de PBS 1X. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS AREA II- BD (*Biosciences*). El FITC fue excitado con láser de argón a 488 nm y la emisión fue colectada a 519 nm y se analizaron entre 3.000 y 10.000 eventos por muestra (Botero, 2015).

2.2.1.4. Protocolo de congelación CGEO

Las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular, en medio completo suplementado con 20% de SFB y 10% de DMSO, guardándose en crio viales. Por cada cultivo celular realizado en cajas

de 6 pozos con una densidad 2×10^6 células/1 mL de DMSO+ SFB al 20%, durante 24 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas y posteriormente se llevaron a nitrógeno líquido ($-192\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de su descongelación (4 meses después).

2.2.2 Preparación de las muestras para cuantificación de proteínas en medios de cultivo

Los medios de cultivo a analizar fueron tomados de cultivos de CGEO, recolectados en un período de 30 días, cambiando los medios cada 24 horas. Se establecieron los días (2, 5, 10 y 30) como referencia para la cuantificación dentro del sistema sensor. Como control, se incluyeron en el análisis una muestra de medio DMEM/F-12 libre de suero y uno de PBS estéril. Las muestras de los medios condicionados fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para los ensayos de evaluación de las proteínas dentro del sistema biosensor, se siguieron los pasos para determinar la cinética de interacción

- Preparación de ligando y analitos
- Ensayos de pre-concentración
- Inmovilización de los anticuerpos (ligando)
- Curva de calibración
- Ensayos de regeneración
- Cuantificación de los factores proteicos (analito)

2.2.2.1. Preparación de ligando y analitos

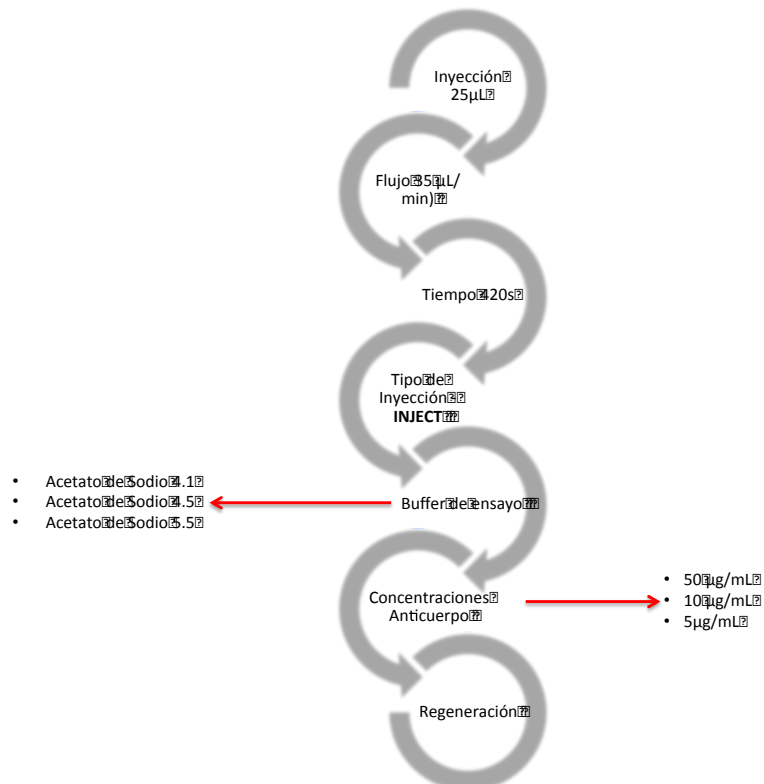
La reconstitución de cada anticuerpo (anti-aFGF, anti-NT-3, anti-NT-4, anti-NOGO-A y anti-MAG) se realizó dependiendo de las indicaciones dadas por el fabricante. El medio de preparación de las muestras una vez reconstituido, fue en el buffer de corrida del equipo HBS-EB.

2.2.2.2. Ensayos de preconcentración

Para determinar la concentración adecuada de inmovilización de los ligandos (anticuerpos), es necesario realizar un ensayo de preconcentración, donde se utilizan diferentes concentraciones de los anticuerpos diluidos en buffer con pH diferentes. Esto permite encontrar mediante interacciones electrostáticas entre la sustancia con la matriz de la superficie sensora del chip y análisis de las curvas de los sensores, la cantidad

óptima del ligando para inmovilizar. La figura 4. Muestra los diferentes pasos para la realización del ensayo en referencia, con la evaluación de los parámetros como concentración del anticuerpo ($\mu\text{g}/\text{mL}$), pH del Buffer (Buffer de acetato), flujo de inyección ($\mu\text{L}/\text{min}$), tipo y tiempo de inyección (s). Después de cada inyección del anticuerpo, se bloquea interacciones de la sustancia sobre la superficie sensora mediante 1M de EDC pH 9.5.

Figura 4. Pasos ensayo preconcentración. Determinación de parámetros para determinar la concentración adecuada de inmovilización de los ligando.



2.2.2.3. Activación de la matriz e inmovilización de los anticuerpos anti-factor

Después de encontrar la concentración óptima del anticuerpo se procede a inmovilizar la sustancia sobre la superficie sensora mediante la formación de un enlace covalente entre el amino terminal ($-\text{NH}_3^+$) del anticuerpo y el carboxilo ($-\text{COOH}$) terminal de la matriz de carboximetildextrano. Para la activación de la matriz se utilizó una mezcla de NHS 0.1M

y EDC 0.4M (1:1), para la formación de éster activo que reacciona con aminas primarias libres, en este caso dada por el anticuerpo (Ritzefeld and Sewald, 2012). Una vez se observa en el sensograma la activación, se procede a inyectar individualmente en cada uno de los canales del chip CM5, los anticuerpos diluidos en el buffer adecuado. Finalmente, se procede a bloquear los sitios activos donde no se unió el anticuerpo con EDC pH 9.5 1M. Las figuras 5 y 6 muestran los pasos descritos anteriormente (ver Figura 5 y 6).

Figura 5. Pasos para la activación de la matriz e inmovilización de los anticuerpos anti-factor. Formación de un enlace covalente entre el amino terminal ($-NH_3^+$) del anticuerpo y el carboxilo ($-COOH$) terminal de la matriz de carboximetildextrano. Formación de éster activo que reacciona con aminas primarias libres, bloqueando los sitios activos.

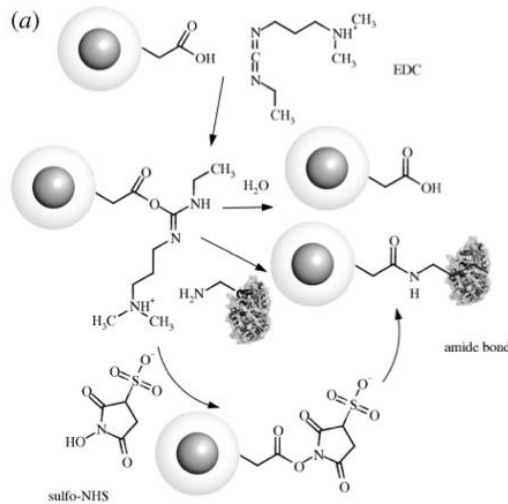
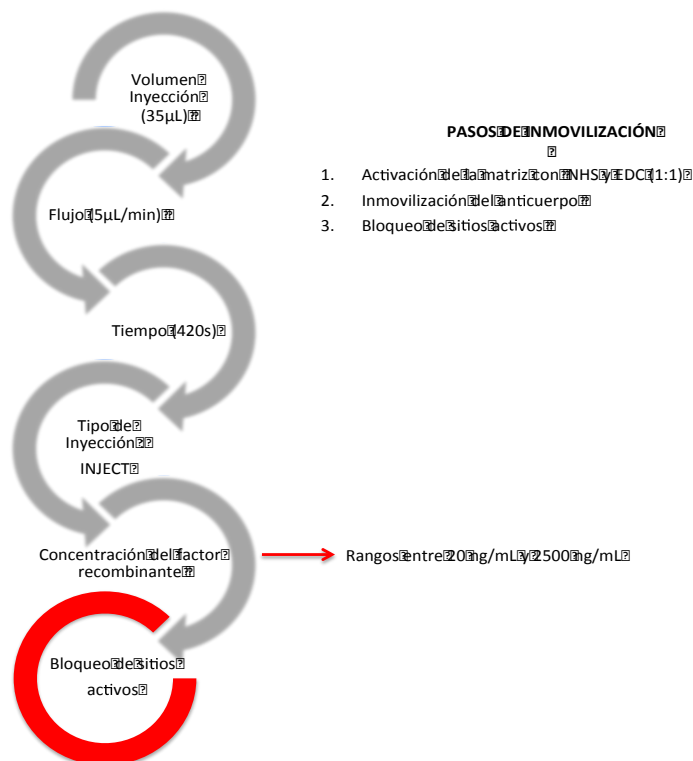
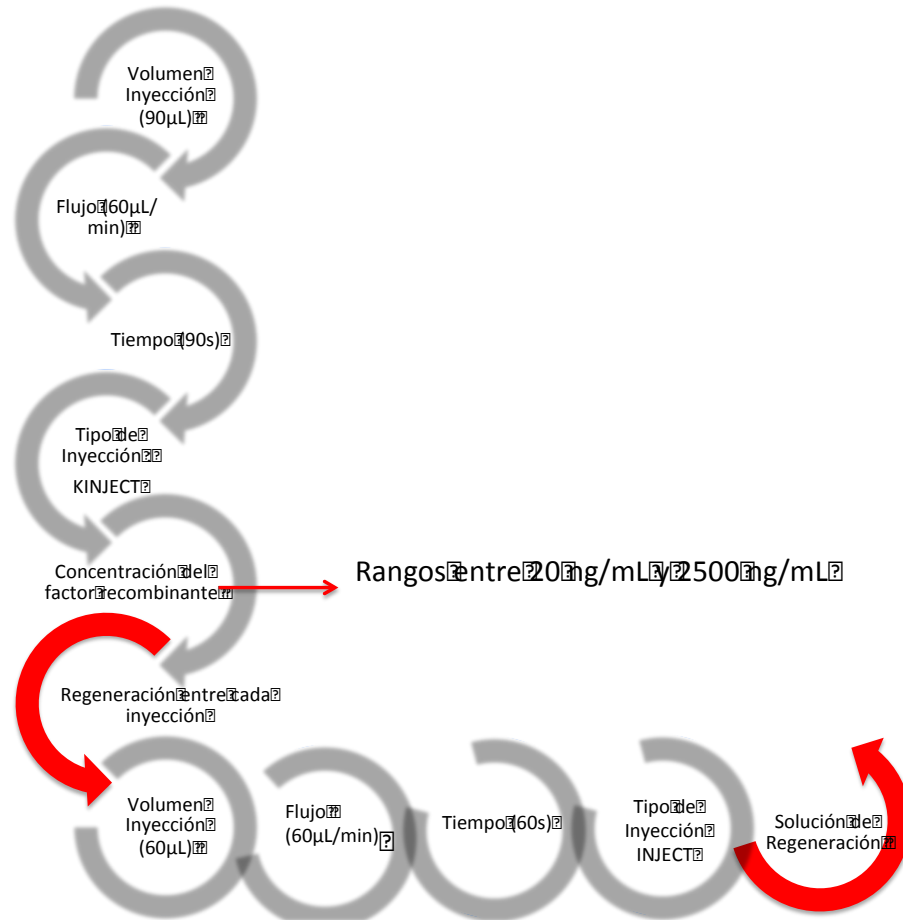


Figura 6: Pasos de Inmovilización. Parámetros para cada proteínas recombinantes (NOGO-A, MAG, aFGF, NT-3 y NT-4).



2.2.2.4 Curvas de calibración para cada proteína recombinante humano

Posterior a la inmovilización de los anticuerpos, se realizaron inyecciones individuales de cada una de las proteínas recombinantes humanas (aFGF, NT-3, NT-4, NOGO-A y MAG) en un rango de dilución de 20 a 2500 ng/mL en Buffer HBS-EB. Cada una de las proteínas fue inyectada en el canal correspondiente de su anticuerpo específico para permitir la unión (ver Figura 7). Los ensayos se realizaron por triplicado y de acuerdo con los lineamientos internacionales de armonización (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2012). Posteriormente, se construyeron las curvas de calibración para cada una de las proteínas recombinantes humanas. El análisis se hizo con el programa *OriginLab* 8.6 (*Origina Lab Corporation*).

Figura 7. Curvas de calibración para cada proteína recombinante humano.

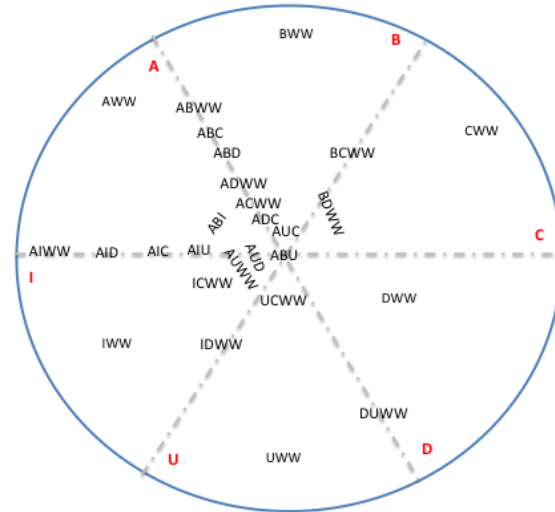
2.2.2.5. Ensayo de regeneración

Entre cada una de las inyecciones de las proteínas recombinantes se hace necesario dejar el ligando disponible para los ensayos de unión, es decir, dejar los sitios de unión libres del anticuerpo cada vez que se hace un ensayo de unión, para que se una su proteína recombinante específica. Para esto, se necesita de soluciones químicas que permitan que ocurra este efecto sin dañar el anticuerpo inmovilizado ni la matriz del chip CM5. Así mismo, se requiere que tenga la concentración y el pH adecuado. Esto se realiza con ciclos de inyección de la solución de regeneración antes de cada nueva asociación de la proteína recombinante.

Tomando modificaciones de estudios encontrados en la literatura se prepararon soluciones de carácter ácido (A), básico (B), iónico (I), quelante (C), detergente (D) y no polar (U). Para cada una de las proteínas se hizo un ensayo de regeneración específico y se midió el porcentaje de regeneración de acuerdo con la ecuación: $[1 - (R_{reg}/R_o) \times 100]$, donde R_{reg} (son las unidades de resonancia después del pulso de inyección de la solución de regeneración y R_o son la unidades de resonancia antes de la inyección). Si el porcentaje de regeneración fue menor al 10%, otra inyección de regeneración se hace necesaria. Si el porcentaje es mayor al 90%, se puede continuar con el siguiente ensayo de unión de la proteína recombinante (Bustos et al., 2014). La gráfica 8 muestra la naturaleza de las soluciones de regeneración y sus combinaciones que fueron realizadas en el presente estudio. La composición de cada una de las soluciones de regeneración se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Tomada de: (Andersson et al., 1999). Soluciones utilizadas para preparar los ensayos de regeneración.

Solución	Composición
Acido (A)	Volúmenes iguales de ácido oxálico, H_3PO_4 , ácido malónico y ácido fórmico, cada un 0.15 M, ajustado a pH 5.0
Básico (B)	Volúmenes iguales de Etanolamina, Na_3PO_4 , piperazina y Glicina, cada uno 0.2 M, ajustado a pH 9.
Iónico (I)	Solución de KSCN (0.46 M), $MgCl_2$ (1.83 M), urea (0.92 M) y guanidina-HCl (1.83 M)
No Polar(U)	Volúmenes iguales de DMSO, formamida, etanol, butanol y Acetonitrilo
Detergente (D)	Solución de 0.3% ((w/w)) CHAPS, 0.3% (w/w) zwittergent 3–12, 0.3% , Tween 80, 0.3%, (v/v) Tween 20 Y 0.3% (v/v) Triton X-100.
Quelante (C)	Solución de EDTA 20 mM

Figura 8. *Soluciones de Regeneración*

W=agua destilada.

Objetivo 2: Analizar y evaluar los factores estimuladores e inhibidores de las CGEO en neuroregeneración en el biosensor.

Para dar cumplimiento a este objetivo, se hizo una cuantificación en medios de cultivos primarios obtenidos previamente y otra cuantificación de las células CGEO cultivadas en el laboratorio, tanto de LP y BO. Como ensayo adicional, se hizo cuantificación de las células transfectadas de CGEO, conocidas como TEG3 y obtenidas mediante la transfección de cultivos primarios de CGEO de BO y nervio olfatorio de ratas adultas, con el plásmido pEF321-T, que expresa el oncogén viral SV40 largo T bajo el control del antígeno promotor EF1a (Kim et al., 1990). Estas células fueron donadas por Centro de Biología Molecular, Severo Ochoa, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. (Moreno-Flores et al., 2003a; Moreno-Flores et al., 2006).

2.2.2.6. Cuantificación de los medios de cultivos de CGEO primarios

Los medios obtenidos previamente de los días 2, 5, 10 y 30, fueron descongelados para procesar dentro del sistema biosensor. Los parámetros utilizados fueron iguales a los descritos en la metodología de unión de las proteínas recombinantes humanas (Figura7). Los medios de cultivo en los diferentes tiempos, fueron inyectados individualmente sobre cada uno de los canales de chip CM5 donde fueron inmovilizados previamente los anticuerpos. Las muestras de los medios de cultivos fueron diluidos

(1:2) en buffer de corrida del equipo HBS-EB. Se permitió la unión de las proteínas presentes en los medios de cultivo con su anticuerpo correspondiente, evidenciándose en las señales de los sensores. Un canal de referencia fue utilizada, inyectando 50 μ L de suero fetal bovino (SFB) 0,05% a pH 5.0, pero sin solución de inmovilización.

Este resultado fue usado para sustraer la señal dada por SFB y minimizar el ruido del fondo de equipo. También se usó medio HBS-EB como blanco. Las unidades de resonancia obtenidas fueron interpoladas individualmente en las curvas de calibración para cada proteína y analizadas mediante el programa *OriginLab* 8.6.

2.2.2.7. Análisis estadístico de las CGEO y sus medios condicionados

Para establecer las diferencias en la concentración de factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) presentes en cultivos de CGEO, se implementó un diseño experimental de dos factores: células y tiempo. El primer factor con dos niveles; células de LP y de BO y El segundo factor con cuatro tiempos de evaluación; 2, 5, 10 y 30 días. Y para determinar si había diferencias en la concentración de factores estimuladores e inhibidores en CGEO como analito, se implementó un diseño experimental aleatorio para la comparación de la expresión de dichos factores en células de LP y BO. Para seleccionar las pruebas de comparación de promedios, Inicialmente, se determinó si las variables presentaban distribución normal la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y adicionalmente se estableció si existía homogeneidad entre las varianzas de cada tipo celular (LP y BO) con el estadístico de Levene.

2.2.2.8. Células de CGEO como analito provenientes de cultivos primarios

Las células tanto de LP como de BO, se descongelaron en baño maría a 37 °C y se llevaron a 10 mL de DMEM-F12 + 10% SFB a la misma temperatura. Se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. El pellet celular obtenido, se resuspendió en 1 mL en el mismo medio (DMEM-F12) sin SFB para incubarlos a 37 °C durante 15 min. Finalmente, las células se lavaron en el mismo medio DMEM-F12 sin SFB y se resuspendieron en 100 μ L de PBS . Se les realizó un conteo en cámara de Neubauer con azul tripano al 0.02%

para verificar viabilidad celular y conocer el número de células presentes en la muestra. Observando una concentración celular de (9×10^5 cel/ mL) en células de BO y de LP posterior a la descongelación mostrando una viabilidad celular del 80%.

Previo a la inyección de las células dentro del biosensor sobre cada uno de los canales que contienen los anticuerpos, se diluyeron en diferentes densidades celulares (1×10^4 , 2.5×10^4 , 1×10^5 y 5×10^5) en 1 mL de PBS 1X para optimizar el ensayo de cuantificación. Se analizaron los resultados obtenidos en los sensograma para determinar la señal óptima de acuerdo con la densidad celular. Para monitorear los eventos de unión fue llevado a cabo un canal de referencia; este canal estaba químicamente activado pero fue bloqueado con Clorhidrato de Etanolamina (ETA) 1M a pH 9.5 después de la activación vía amina. Así mismo, se inyectó directamente medio puro utilizado para el cultivo de las células y PBS para determinar ruido de fondo. La señal dada por el PBS fue sustraído de los resultados obtenidos para las células. Los ensayos realizados dentro del sistema biosensor fueron realizados por triplicado. Los resultados obtenidos en los sensograma en unidades de resonancia (UR) fueron interpolados en las curvas de calibración para cada uno de los factores proteicos.

2.2.2.9. Células transfectadas de CGEO (TEG3) como analito

Las células transfectadas TEG3 fueron descongeladas utilizando el protocolo de descongelación de (Moreno-Flores et al., 2003a). Al día 10 del cultivo se le realizó conteo en cámara de Neubauer con azul tripano al 0.02% para verificar viabilidad celular y conocer el número de células presentes en la muestra, observándose una concentración celular de 8×10^5 y viabilidad del 80%. Posteriormente, al día 10 del cultivo se realizó citometría de flujo para determinar el porcentaje de CGEO presente utilizando los marcadores p75^{NTR} con FITC específico de las CGEO y GFAP con Cy3 (Turner and Pérez-Polo, 1992; Ramón-Cueto et al., 1993). Finalmente, fueron analizadas por medio del biosensor, para cuantificar las proteínas promotoras e inhibidoras de neuroregeneración presentes. El protocolo de preparación de las células para los ensayos dentro del biosensor, fue igual al descrito para las células CGEO provenientes de cultivos primarios.

Objetivo 3. Validar la metodología de cuantificación del biosensor mediante la aplicación del método de Elisa

Con el fin de comparar los datos obtenidos en la metodología establecida por el biosensor y evaluar la precisión del mismo se realizó un inmunoensayo (ELISA). De acuerdo, con los resultados obtenidos en la cuantificación de los medios de cultivo, se escogió una proteína promotora (NT-3) y una proteína inhibidora (NOGO-A) para realizar los ensayos de comparación con ELISA. Para la elaboración de las curvas de calibración, se incubaron 100 μ L de las proteínas recombinantes (*recombinant human Nogo-A* y *recombinant neurotrophin 3 (NT-3)*) en un rango de concentración de 2000-20 pg/mL durante 8 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se hizo un bloqueo de los sitios inespecíficos con 100 μ L de leche descremada en PBS al 5% y se dejó en incubación durante 2 horas a 37°C. Luego, se incubó por dos horas 100 μ L a 37°C los anticuerpos (*Rabbit Polyclonal anti-NOGO- A* y *Rabbit polyclonal anti-NT-3*) sobre los pozos correspondientes a cada una de las proteínas. Finalmente, se adicionó 100 μ L de *Anti-Rabbit IgG* (anticuerpo secundario) marcado con peroxidasa por dos horas a 37°C. El sustrato para revelar que se usó fue TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) solución 1 y TMB solución 2 (1:1). Para detener la reacción se utilizaron 50 μ L de H₂SO₄ 1N. Entre cada una de las incubaciones, se hicieron tres lavados con PBS 1X+Tween-20 0,05%. Las placas de ELISA fueron leídas con un lector de placas (*Dynex Technologies*) con una resolución de 0.0001 unidades de densidad óptica (OD) a una longitud de onda de 450 nm.

Para el caso de las muestras de los medios condicionados, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente a excepción de la incubación inicial, que no se hizo con las proteínas recombinantes sino con los anticuerpos (*Rabbit Polyclonal anti-NOGO-A* y *Rabbit polyclonal anti-NT-3*). Esto con el fin de permitir la unión de los anticuerpos con las proteínas presentes en los medios de cultivo. El volumen utilizado de los anticuerpos fue de 100 μ L a una concentración de 1 mg/mL para *Rabbit Polyclonal anti-NOGO-A* y 0,5 mg/mL de *Rabbit Polyclonal anti-NT-3*.

Tabla.7. Placas lectura método ELISA para las proteínas facilitadora NT-3 e inhibidora NOGO-A.

Neurotrofina 3 NT-3

		Curva de calibración			Cuantificación de medios			
A	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B		2000 pg/mL	2000 pg/mL	BO2	BO2	LP2	LP2	
C		1500 pg/mL	1500 pg/mL	BO5	BO5	LP5	LP5	
D		1000 pg/mL	1000 pg/mL	BO10	BO10	LP10	LP10	
E		500 pg/mL	500 pg/mL	BO30	BO30	LP230	LP30	
F		250 pg/mL	250 pg/mL	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	
G		0 pg/mL	0 pg/mL	PBS	PBS	PBS	PBS	
H								

NOGO-A

		Curva de calibración			Cuantificación de medios			
B	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B		2000 pg/mL	2000 pg/mL	BO2	BO2	LP2	LP2	
C		1500 pg/mL	1500 pg/mL	BO5	BO5	LP5	LP5	
D		1000 pg/mL	1000 pg/mL	BO10	BO10	LP10	LP10	
E		500 pg/mL	500 pg/mL	BO30	BO30	LP230	LP30	
F		250 pg/mL	250 pg/mL	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	
G		0 pg/mL	0 pg/mL	PBS	PBS	PBS	PBS	
H								

2.3 Consideraciones éticas

La obtención de las células de CGEO procedentes de los tejidos olfatorios del modelo animal neonatal cumplieron con el desarrollo de la investigación dentro de la reglamentación solicitada por las organizaciones relacionadas con ciencia y tecnología de animales de laboratorio (ILAR, *Internacional Laboratory Animal Research*, 1994; 64/432/ CEE, Comunidad Económica Europea 93/119/CE y modificada 526/CE-2007). La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia en Acta número 002-014-15 (12 de febrero 2015), para las cirugías de extracción de las células CGEO, se aplicaran todas las normativas de las 3 R de Russell y Burch (*Russell y Burch*, 1959) y las recomendaciones del ILAR (*Internacional Laboratory Animal Research*) (ILAR, 1994) 64/432/CEE, 93/119/CE y modificada 526/CE-200.

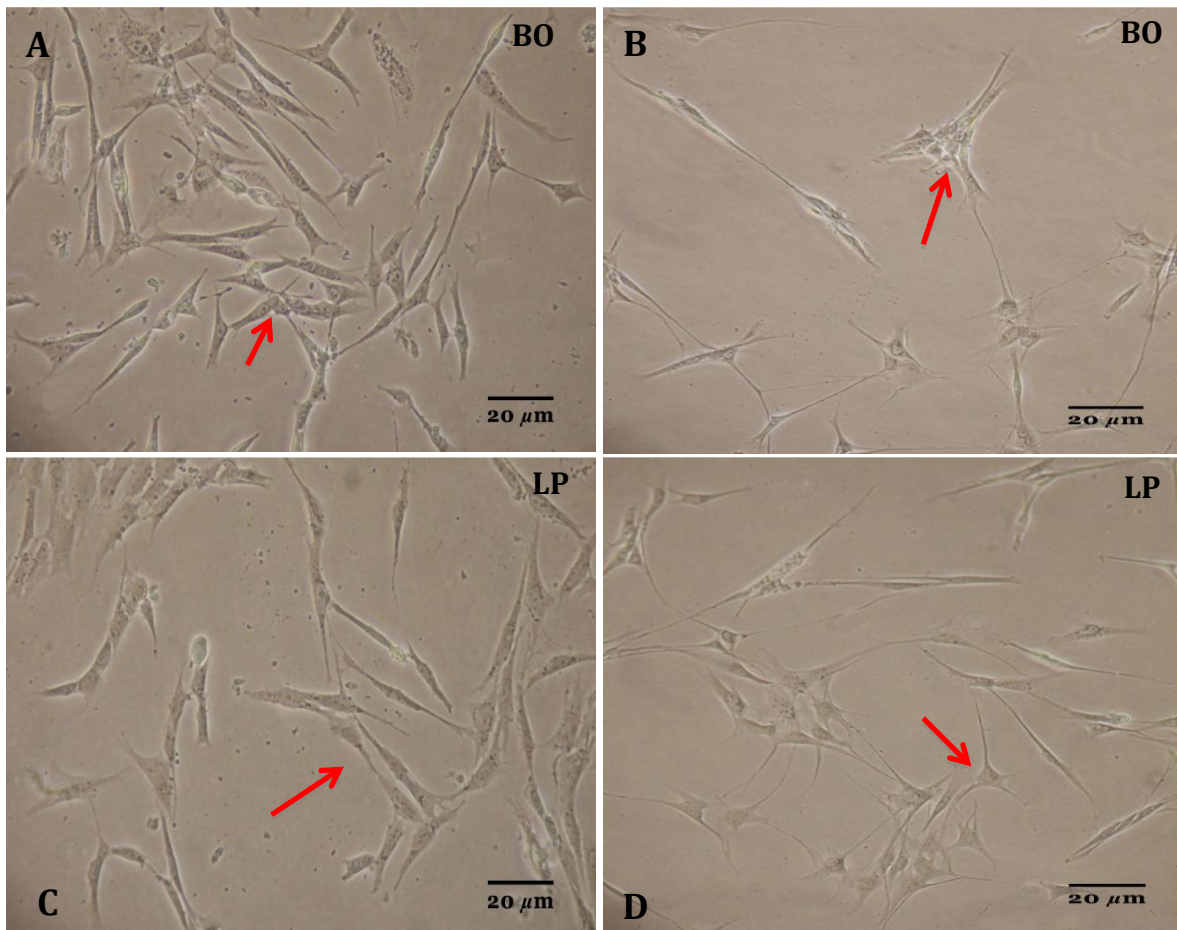
3. Resultados

Objetivo 1. Estandarizar la metodología de cuantificación de factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración presentes en cultivos de CGEO y sus medios condicionados por medio de biosensores.

3.1. Cultivo celulares CGEO primarios

Para la purificación de los cultivos de CGEO provenientes de BO y LP fue necesario realizar una separación utilizando las adhesiones diferenciales a través del tiempo. Debido a que coexiste poblaciones como los astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Doucette, 1990, 1996; Ramon-Cueto et al., 2000). La literatura reporta que las CGEO tienen una forma elongada con un fino proceso laminar que envuelve los nervios olfatorios *in situ*, su morfología en cultivo es característica por su forma plana bipolar o tripolar como se ve en la figura 9. Se conoce que dos poblaciones de células provenientes de BO y de LP de la mucosa olfatoria (Franssen et al., 2007) muestran heterogeneidad morfológica, funcional y antigénica (Ramon-Cueto et al., 1998; Sasaki et al., 2004).

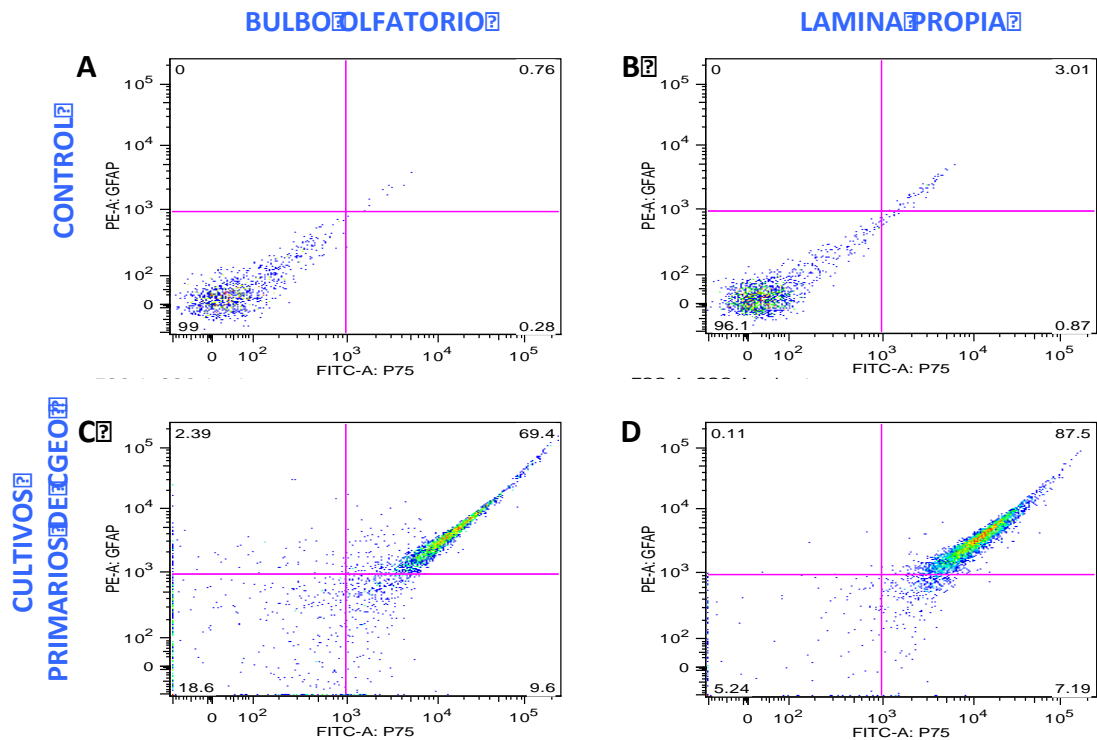
Figura 9. Cultivos primarios de CGEO provenientes de BO y LP. Muestran los fenotipos de estas células observadas al día 10 de los cultivo celulares. como lo reporta la obtención y purificación de (Nash et al., 2001) con modificaciones de (Gómez, 2009). Microscopio invertido **A** y **B**. Cultivos de BO se observa la morfología fibroblástica con forma fusiforme. **C** y **D**. Cultivos de LP se observa la morfología astrocítica, es decir células poliédricas con proyecciones largas.



3.1.1. Determinación fenotípica de las células CGEO primarios. Citometría de Flujo

Los resultados obtenidos en la citometría de flujo para los cultivos primarios de CGEO con adhesión diferencial tanto para LP como para BO usando marcaje de p75^{NTR}-FITC y GFAP-Cy3, muestra un porcentaje de células positivas para BO de un 69.4% en comparación con el porcentaje de células positivas para LP correspondiente a un 87.5%. Figura 10.

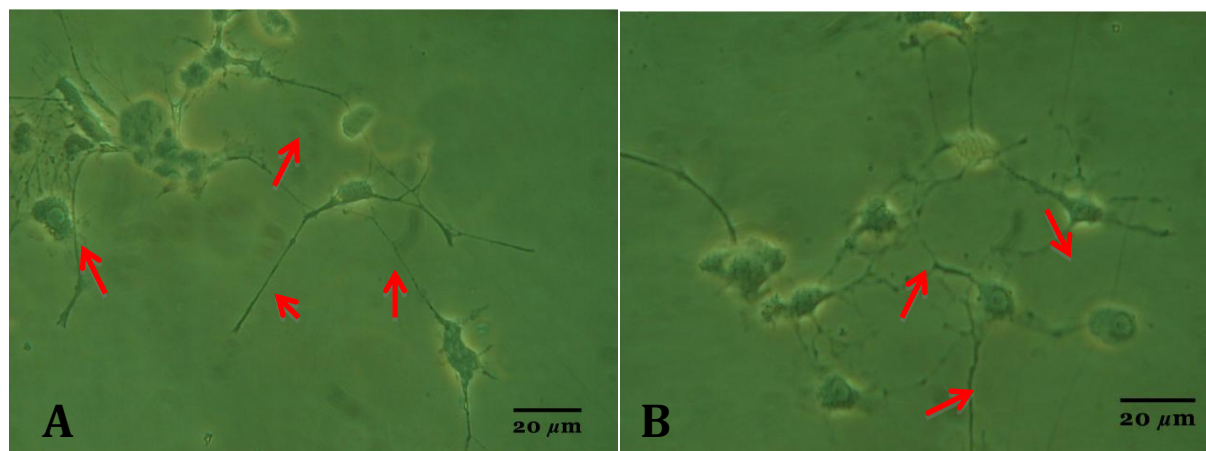
Figura 10. Citometría de flujo. Análisis de datos de cultivos primarios de BO y LP provenientes de (CGEO) obtenido por adhesión diferencial. Con marcaje para p75^{NTR} y GFAP. **C.** Porcentaje de 69.4 % de Células de BO marcadas **D.** Porcentaje de 87.5% de Células de LP marcadas **A.** y **B.** Control para BO y Control para LP respectivamente



3.2. Cultivos celulares de líneas TEG3 (CGEO transfectadas)

Las TEG-3 fueron donadas amablemente por el Dr. Francisco Wandosell y la Dra. M. Teresa Moreno-Flórez del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España. Fueron descongeladas siguiendo las recomendaciones dadas por la Dra. Moreno-Flórez, usándose extracto de pituitaria bovina-GIBCO®, medio DMEN-F12, antibiótico-antimicótico, y SFB al 20%. Las TEG-3 se mantuvieron durante 15 días en cajas de pozos de 28 (*Thermo Scientific*) con 500 uL del medio anteriormente mencionado. Se hizo observación microscópica diaria y cambiando medio cada 2 días. Se tomaron muestras de las células transfectadas y del medio condicionado el día 10 para analizar mediante biosensores y citometría de flujo.

Figura 11. A y B. Cultivo de CGEO transfectadas TEG3. Tomada al día 10 del cultivo. Se observa una estructura de tipo astrocítica y muestra neuritas con mayor longitud. Se usó filtro verde de microscopia invertido. Todas las células mantienen la misma morfología a través del tiempo de cultivo.

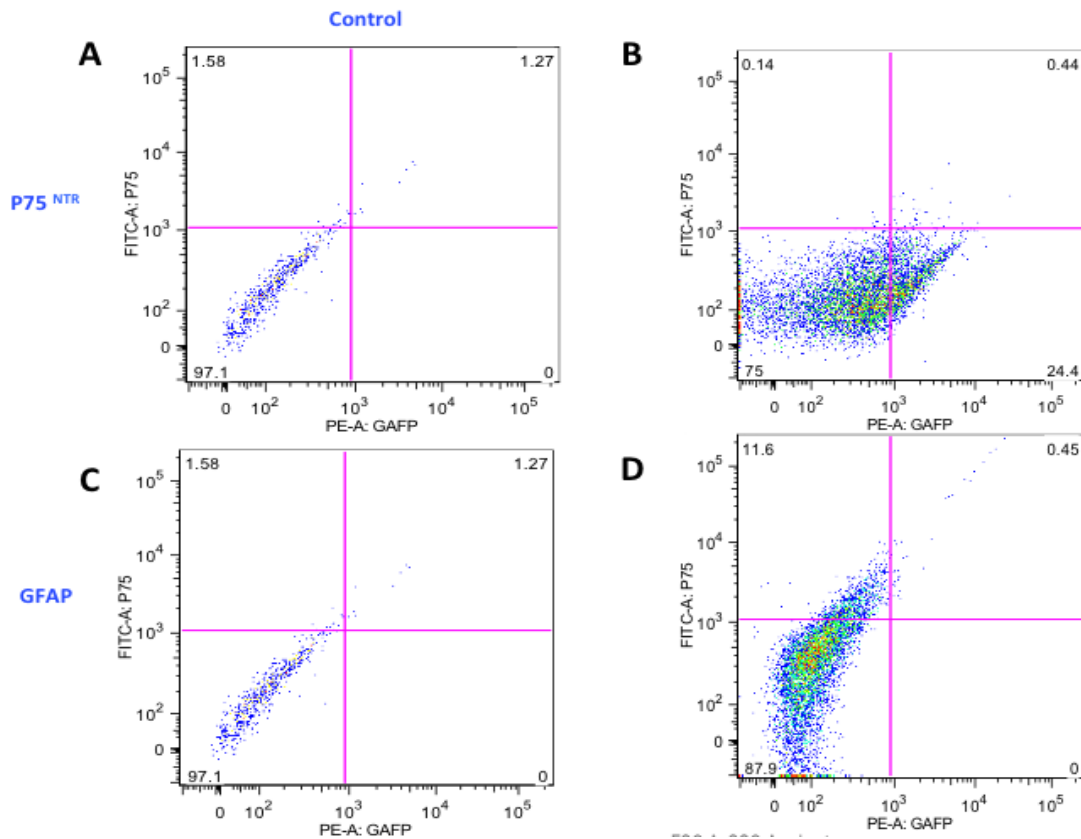


3.2.1. Determinación fenotípica de líneas TEG3 (CGEO transfectadas). Citometría de Flujo

Los cultivos de TEG3, obtenidos de cultivos primarios de BO de ratas adultas se analizaron utilizando citometría de flujo con los marcadores p75^{NTR} - FITC y GFAP – Cy3

en equipo FACS AREA II. Se hizo evaluación de estos cultivos Figura. 12. De A-F. Obteniéndose un resultado de 24.4 % para P75^{NTR} Y de GFAP el 80 %.

Figura 12. Citometría de Flujo de cultivos transfectadas de CGEO (TGE3). Mostrando el porcentaje de células positivas para p75^{NTR} y GFAP. **A** y **C** Controles para ambos marcadores. **B.** Porcentaje de 24.4 % de p75^{NTR} y **D.** Porcentaje de 87.9% de GFAP en Células de BO marcadas.



3.3. Resultados de cuantificación

- Ensayos de pre-concentración
- Inmovilización de los anticuerpos (ligando)
- Curva de calibración
- Ensayos de regeneración
- Cuantificación de los factores proteicos (analito)

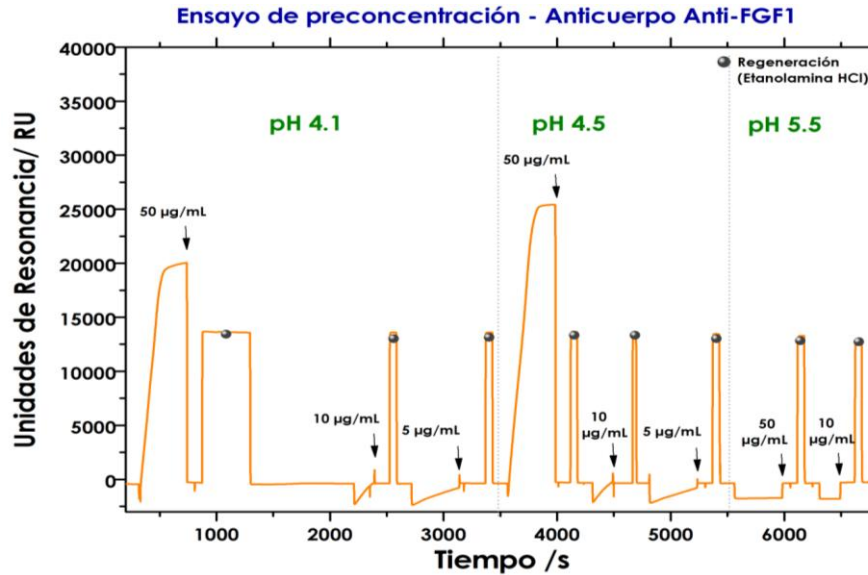
3.3.1. Ensayos de preconcentración

Basados en la naturaleza química de cada una de las proteínas y dependiendo de su peso molecular y la reconstitución, se hicieron ensayos de preconcentración con el fin de determinar el pH correcto del buffer para poder inmovilizar el anticuerpo y permitir la unión adecuada de la proteína. De acuerdo a los resultados obtenidos se tomó el pH del buffer de inmovilización por debajo del punto isoeléctrico de cada anticuerpo. Se encontró la concentración adecuada mediante el análisis de los sensograma, de acuerdo con las curvas de asociación y disociación claramente definidas, con mayor amplitud y mayor valor en las unidades de resonancia. Los parámetros obtenidos como resultado del ensayo de preconcentración se muestran en la tabla 8.

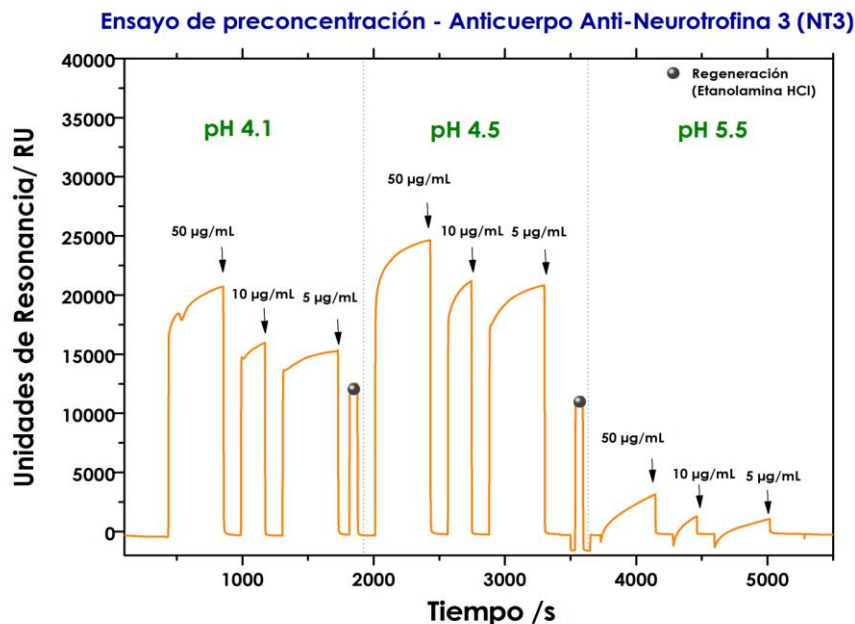
Tabla 8. Concentraciones y pH del buffer óptimos para cada anticuerpo utilizado.

PRECONCENTRATION			IMMOBILIZATION	
PROTEINA	FLOW (μL/min)	CONCENTRACIÓN (μg/mL)	pH BUFFER	(RU)
<i>Anti-FGF1 antibody</i>	5	50	4.5	11786
<i>Anti-Neurotrophin antibody</i>	3	5	4.5	12376
<i>Anti-Neurotrophin antibody</i>	4	5	4.5	12413
<i>Anti-NOGO-A Antibody</i>	5	50	4.1	15224
<i>Anti-MAG Antibody</i>	5	50	4.5	11672

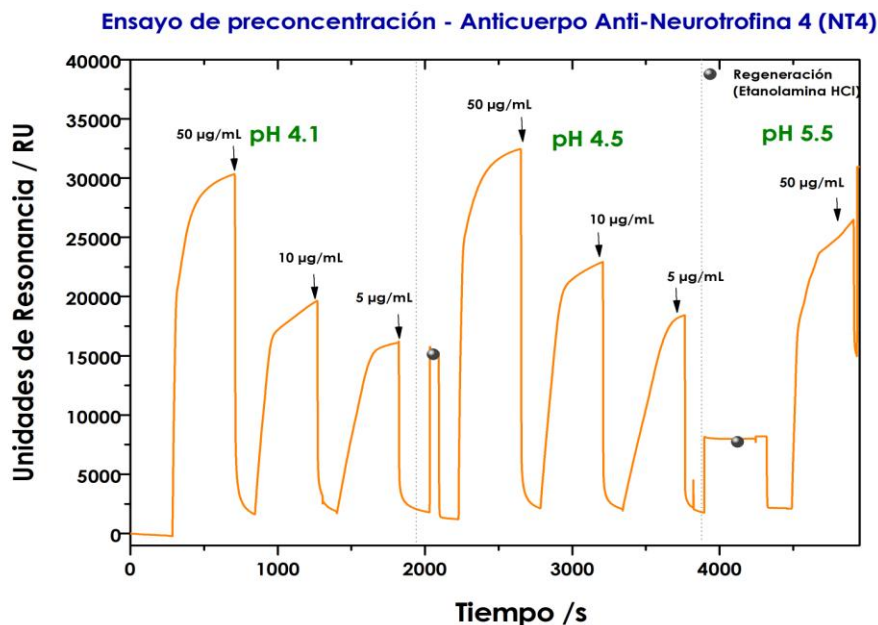
Gráfica 1. Ensayo de preconcentración del Anticuerpo anti- aFGF1. Muestra el ensayo de preconcentración en función del tiempo del anticuerpo anti-aFGF, mostrando una mayor respuesta al utilizar buffer de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) a un pH de 4.5 y con una concentración de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ representando los datos en RU.



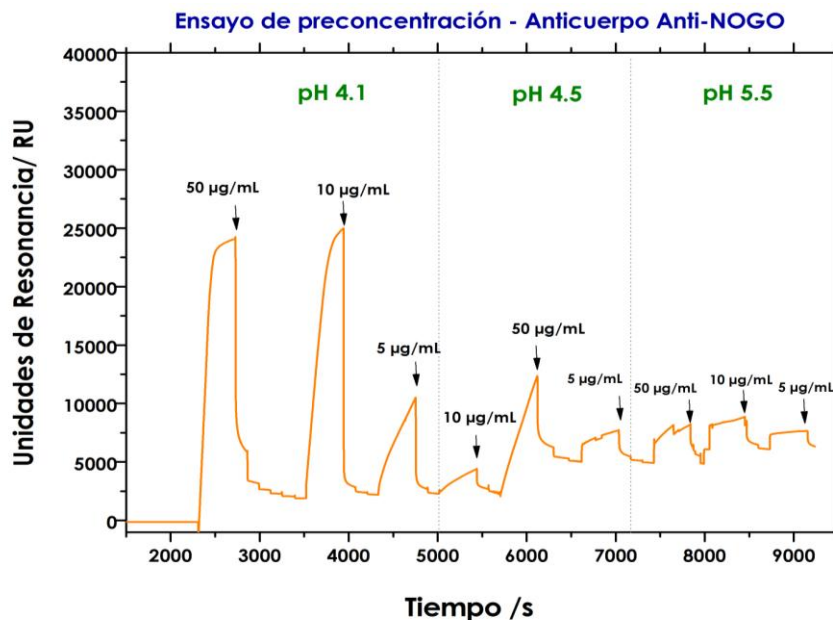
Gráfica 2. Ensayo de preconcentración del Anticuerpo Anti Neurotrofina (NT-3). Muestra el ensayo de preconcentración en función del tiempo del anticuerpo anti-Neurotrofina 3 (NT-3), mostrando una mayor respuesta al utilizar buffer de $C_2H_3NaO_2$ un pH de 4.5 y con una concentración de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ representando los datos en RU.



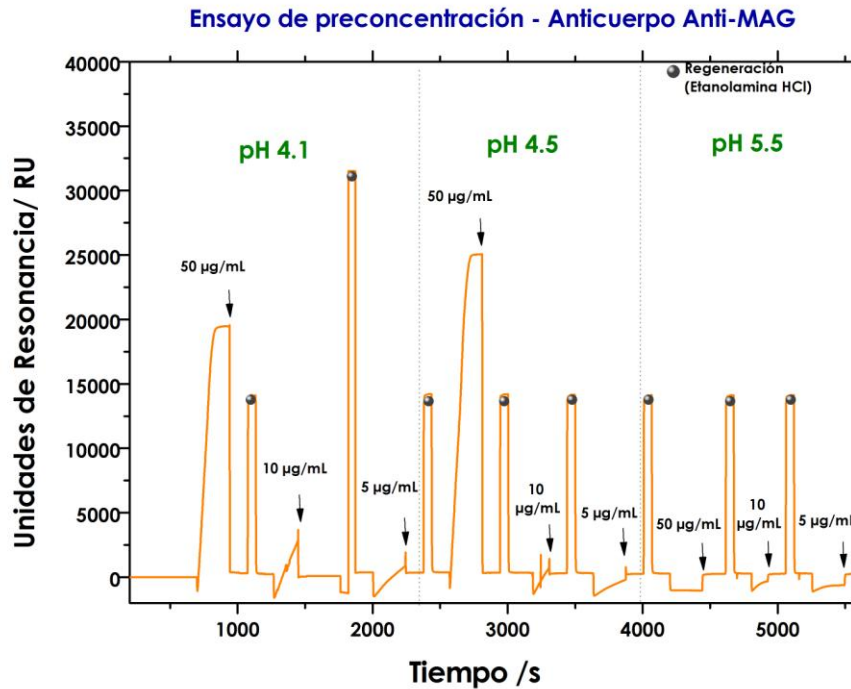
Gráfica 3. Ensayo de preconcentración del Anticuerpo Anti-Neurotrofina 4 (NT-4). Muestra el ensayo de preconcentración en función del tiempo del anticuerpo anti-Neurotrofina 4 (NT-4), mostrando una mayor respuesta al utilizar el buffer de $C_2H_3NaO_2$ a un pH de 4.5 y con una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ representando los datos en RU.



Gráfica 4. Ensayo de preconcentración del Anticuerpo anti-NOGO-A. Muestra el ensayo de preconcentración en función del tiempo del anticuerpo anti-NOGO-A representando los datos en RU mostrando una mayor respuesta al utilizar el buffer de $C_2H_3NaO_2$ a un pH de 4.1 y con una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ del anticuerpo monoclonal anti-NOGO-A.



Gráfica 5. Ensayo de preconcentración del Anticuerpo anti MAG. Muestra el ensayo de preconcentración en función del tiempo en la proteína MAG, mostrando una mayor respuesta al utilizar el buffer de $C_2H_3NaO_2$ a un pH de 4.5 y con una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ representando los datos en RU.



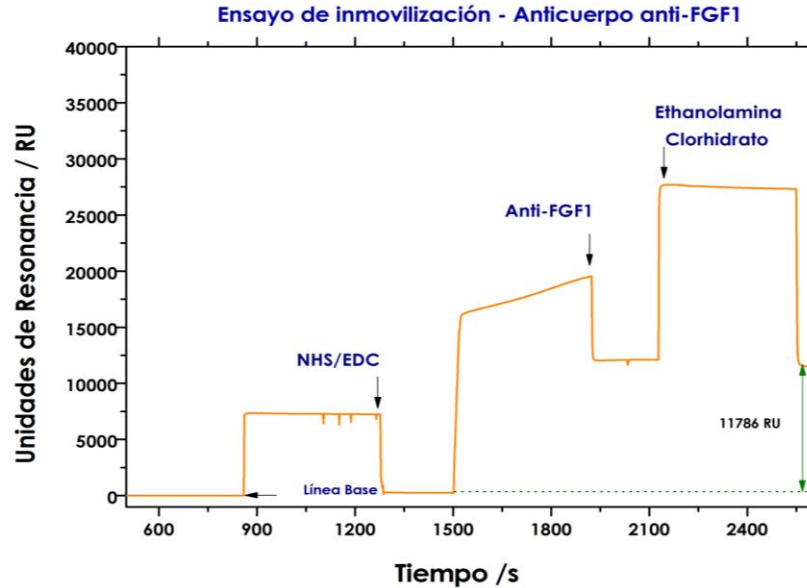
Ensayos de Inmovilización de los anticuerpos

Los resultados obtenidos para cada uno de los anticuerpos muestran las curvas típicas de inmovilización:

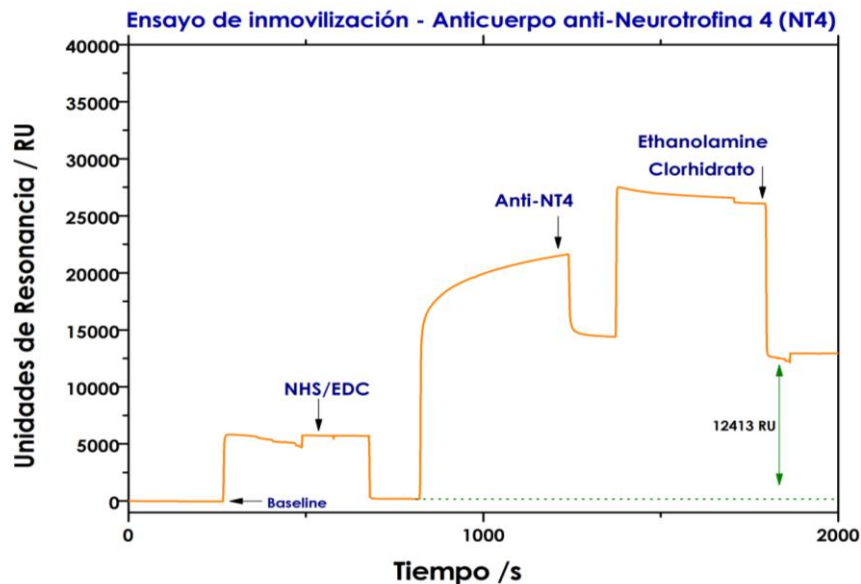
1. Activación de la matriz vía amina, con aumento en las unidades de resonancia sobre 5000 RU características para superficies de dextrano
2. Inmovilización de los anticuerpos con cambio en las RU superior a 1000 y
3. Bloqueo de sitios activos con Clorhidrato de Etanolamina 1M a pH 9.5

Las gráficas 6 a la 10 muestran los sensograma respectivos.

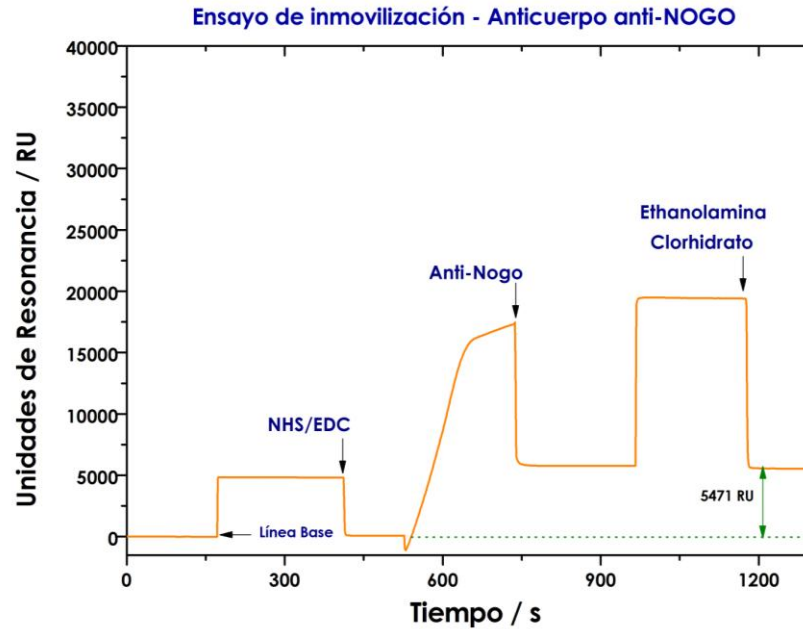
Gráfica 6. Inmovilización del anticuerpo anti- aFGF. Muestra la inmovilización del anticuerpo anti-aFGF en la superficie del chip CM5 en el biosensor Biacore® 2000 por medio de la química de acoplamiento vía amina. Se evidencian la activación de la superficie con NHS/EDC, la inmovilización del ligando, bloqueo de los sitios activos libres con Clorhidrato de Etanolamina (ETA) 1M a pH 9.5 y la línea base. El valor de inmovilización fue de 11.786 RU



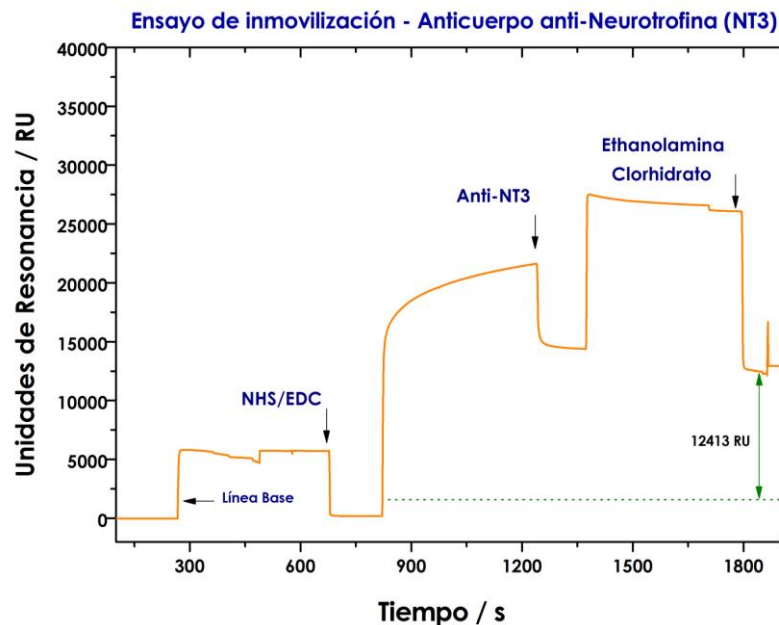
Gráfica 7. Inmovilización del anticuerpo anti- NT-3. Muestra la inmovilización del anticuerpo anti-NT-3 en la superficie del chip CM5 del biosensor Biacore® 2000 por medio de la química de acoplamiento amina. Se evidencian la activación de la superficie con NHS/EDC, la inmovilización del ligando, bloqueo de los sitios activos libres con ETA 1M a pH 9.5 y la línea base. El valor de inmovilización fue de 12.413 RU.



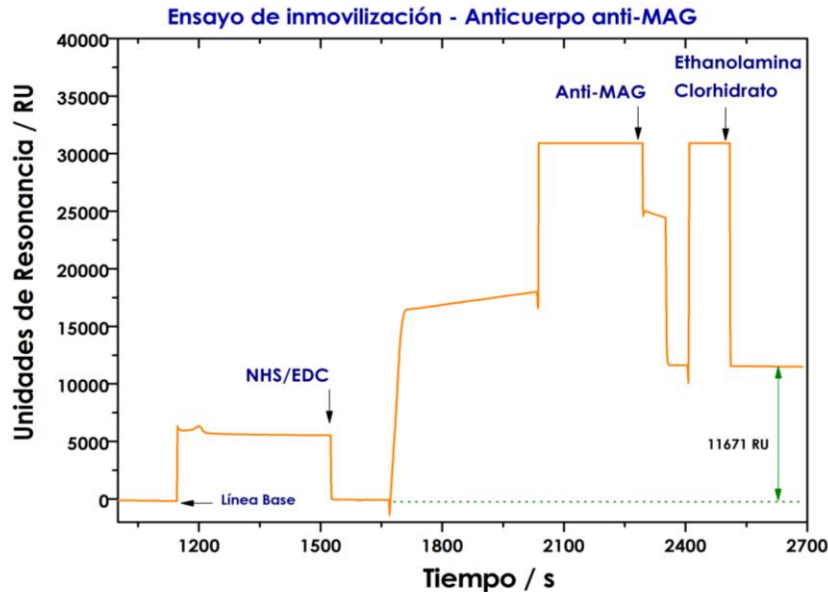
Gráfica 8. Inmovilización del anticuerpo anti- NT-4. Muestra la inmovilización del anticuerpo anti-NT-4 en la superficie del chip CM5 en el biosensor Biacore® 2000, por medio de la química de acoplamiento amina. Se evidencian la activación de la superficie con NHS/EDC, la inmovilización del ligando, bloqueo de los sitios activos libres con ETA 1M a pH 9.5 y la línea base. El valor de inmovilización fue de 12.413 RU.



Gráfica 9. Inmovilización del anticuerpo anti- NOGO-A. Muestra la inmovilización del anticuerpo anti-NOGO-A en la superficie del chip CM5 en el biosensor Biacore® 2000, por medio de la química de acoplamiento amina. Se evidencian la activación de la superficie con NHS/EDC, la inmovilización del ligando, bloqueo de los sitios activos libres con ETA 1M a pH 9.5 y la línea base. El valor de inmovilización fue de 5.471 RU.



Gráfica 10. Inmovilización del anticuerpo anti-MAG. Muestra la inmovilización del anticuerpo anti-MAG en la superficie del chip CM5 en el biosensor Biacore® 2000, por medio de la química de acoplamiento amina. Se evidencia la activación de la superficie con NHS/EDC, la inmovilización del ligando, bloqueo de los sitios activos libres con ETA 1M a pH 9.5 y la línea base. El valor de inmovilización fue de 11.671 RU.



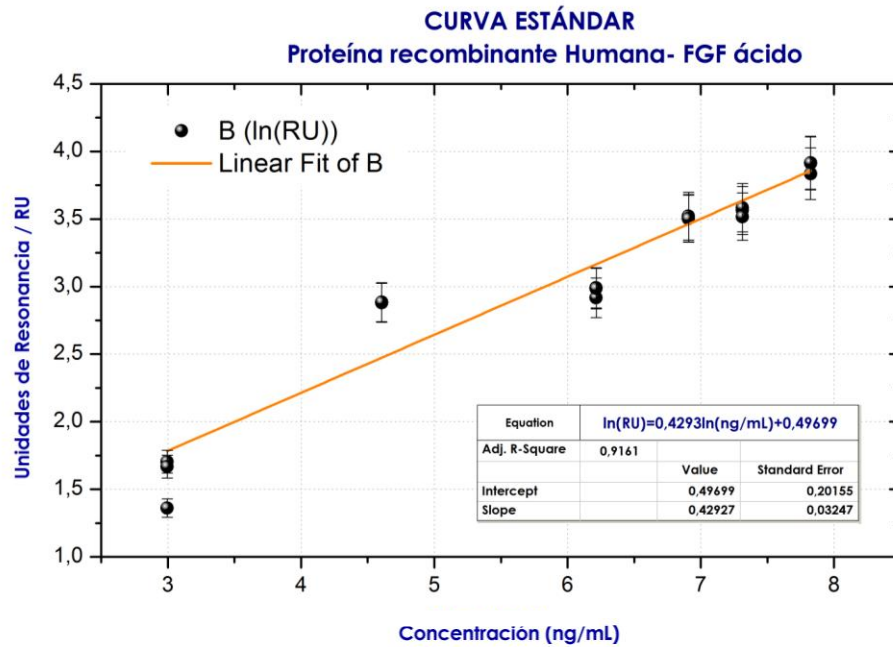
3.3.3. Ensayo de unión de proteínas recombinantes

Los ensayos de unión para cada proteína recombinante se realizaron por triplicado con diferentes concentraciones (2.500, 1.500, 1.000, 500, 100 y 20 ng/mL). Se observa reproducibilidad y selectividad conservando las características adecuadas para las gráficas de unión. Una vez encontrados las RU se hizo un análisis de regresión lineal para encontrar la pendiente y la ecuación de la recta para cada una de las proteínas utilizadas.

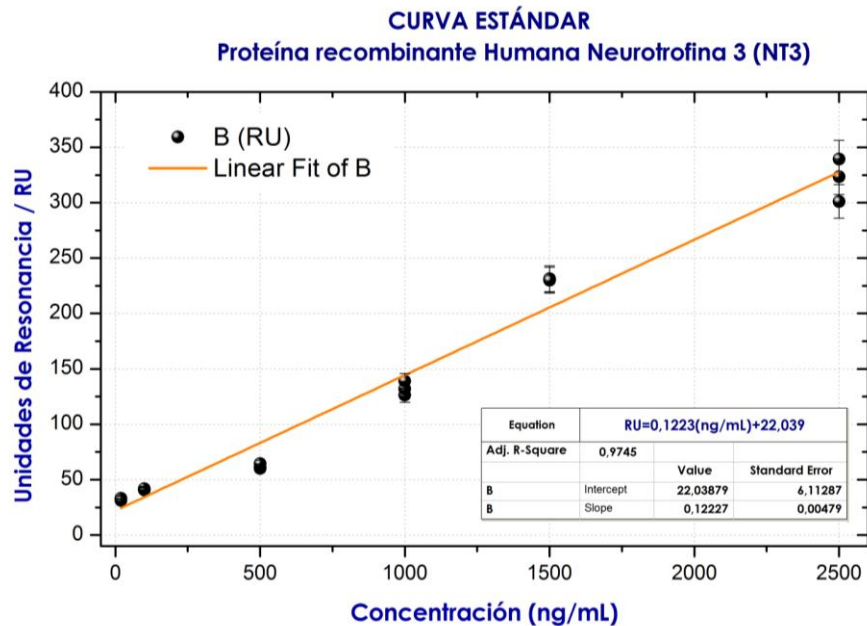
De esta manera se elaboró la curva de calibración, que se usará posteriormente para los ensayos de cuantificación de los cultivos y sus medios mediante interpolación dentro de la recta.

Proteínas estimuladoras de regeneración axonal

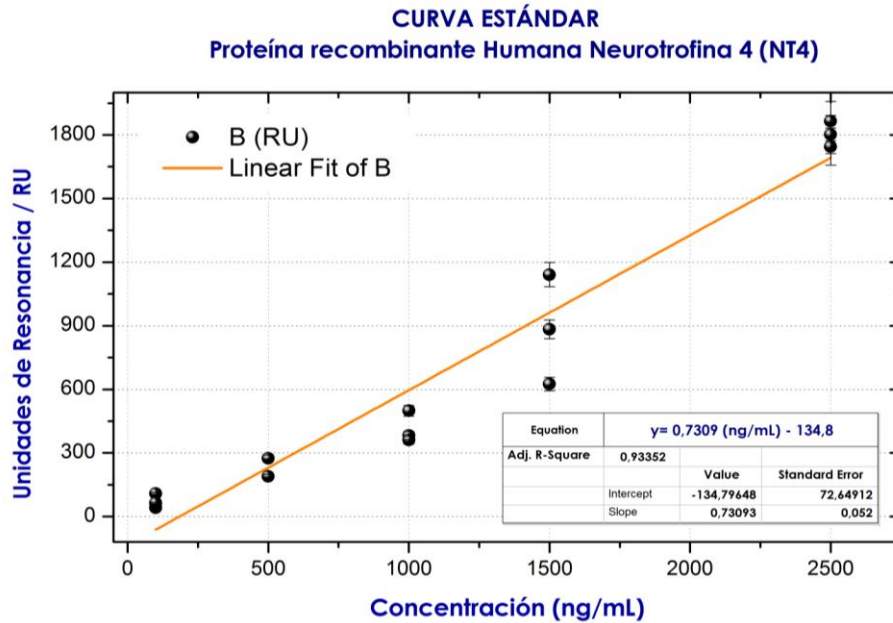
Gráfica 11. Curva estándar para la cuantificación de la proteína recombinante aFGF en los medios de cultivos. Se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína (2.500, 1.500, 1.000, 500, 100 y 20 ng/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado. R^2 : 0.9161.



Gráfica 12. Curva estándar para la cuantificación de la proteína Neurotrofina 3 (NT-3) en los medios de cultivos. Se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína (2.500, 1.500, 1.000, 500, 100 y 20 ng/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado. R^2 : 0.9745.

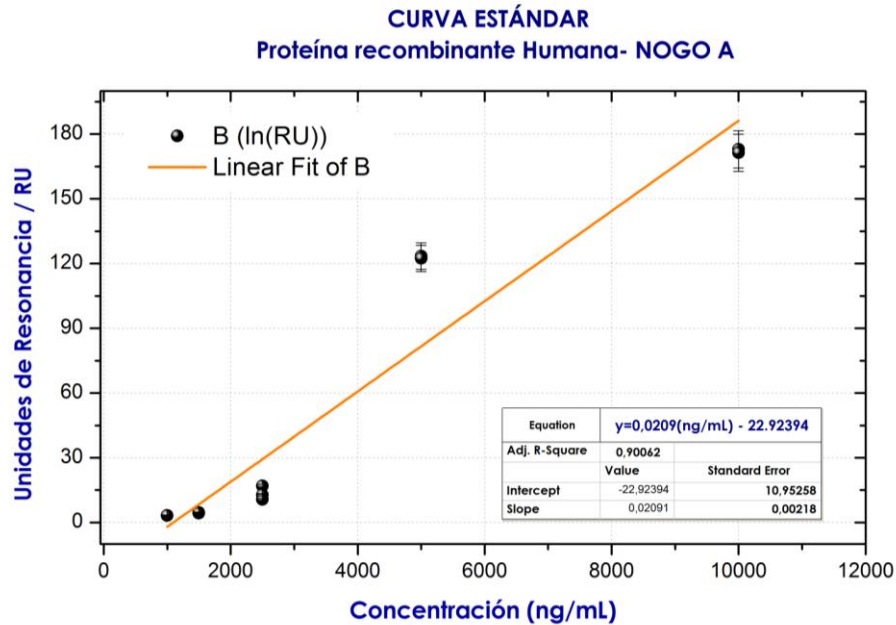


Gráfica 13. Curva estándar para la cuantificación de la proteína recombinante Neurotrofina 4 (NT-4) en los medios de cultivos. Se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína (2.500, 1.500, 1.000, 500, 100 y 20 ng/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado. R^2 : 0.93352.

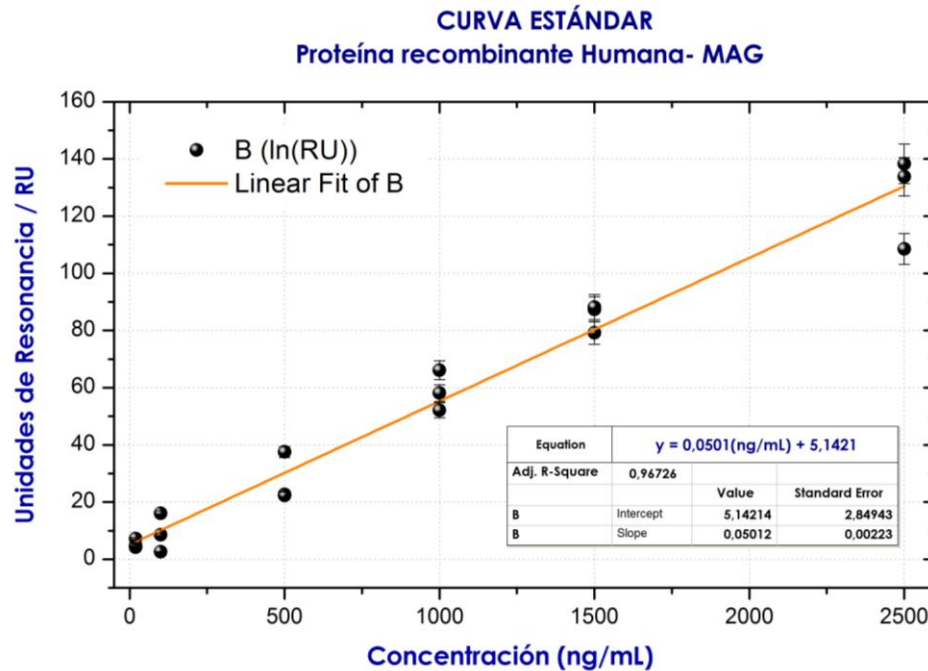


Proteínas inhibidoras de regeneración axonal

Gráfica 14. Curva estándar para la cuantificación de la proteína recombinante NOGO-A en los medios de cultivos. Se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína (2.500, 1.500, 1.000, 500, 100 y 20 ng/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado. R^2 : 0.90062.



Gráfica 15. Curva estándar para la cuantificación de la proteína recombinante MAG en los medios de cultivos. Se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína (2.500, 1.500, 1.000, 500, 100 y 20 ng/mL). Los ensayos se realizaron por triplicado. R^2 : 0.96726.



3.4. Cuantificación de los medios condicionados de CGEO

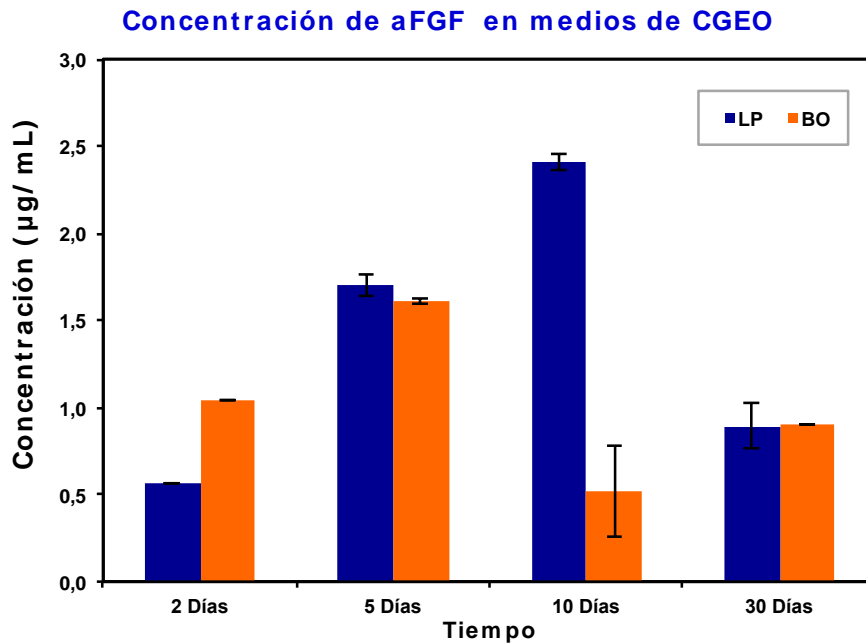
Las muestras de los medios condicionados con dilución 1:2 fueron inyectadas individualmente dentro de los canales donde fueron inmovilizados previamente los anticuerpos. Los resultados obtenidos de cada uno de los medios en los diferentes días (2,5,10 y 30), fueron interpolados en las curvas estándar correspondientes.

Posteriormente se hizo un análisis de cálculo de la concentración en $\mu\text{g/mL}$ de acuerdo con la recta de la curva y análisis estadístico de los resultados. Las gráficas de 16 a la 20 muestran los resultados estadísticos y de cuantificación para cada una de las proteínas a los diferentes días.

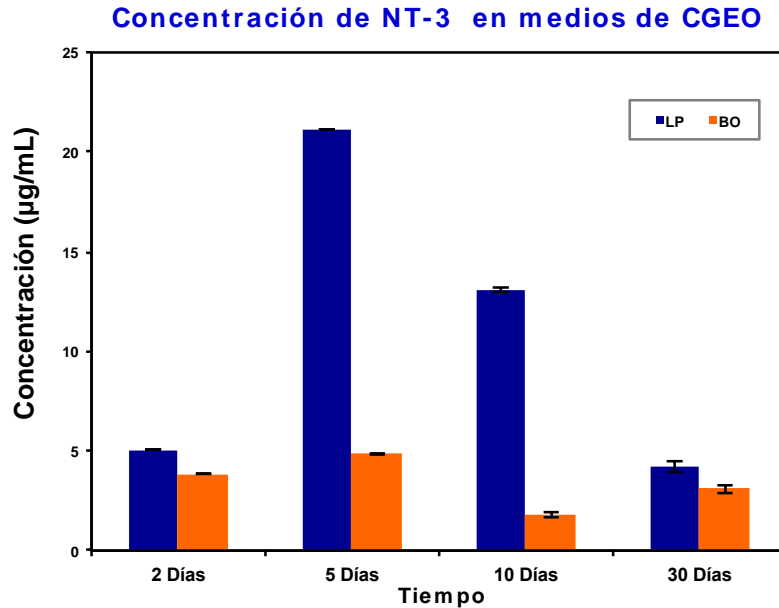
Objetivo 2. Analizar y evaluar los factores estimuladores e inhibidores de las CGEO en neuroregeneración en el biosensor.

Proteínas estimuladoras en medios de cultivos de las CGEO

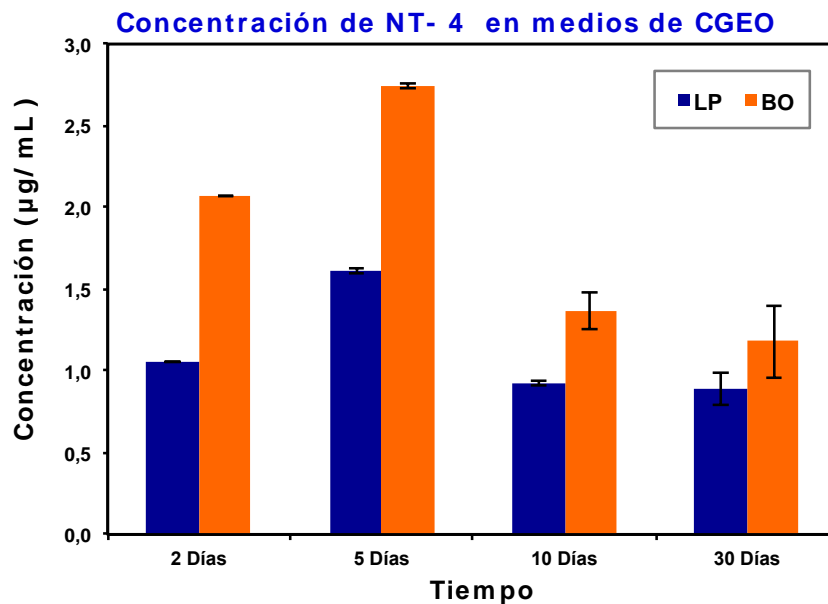
Gráfica 16. Cuantificación de la proteína (aFGF) en medios condicionados. La figura muestra las concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de la proteína aFGF presentes en los medios de cultivo de las CGEO de BO y LP en los días 2, 5, 10 y 30 de cultivo primarios. Se muestra una mayor expresión del factor en los cultivos de células LP a los diez días ($2,4085 \mu\text{g}/\text{mL}$), seguida por los cultivos de BO ($1,606 \mu\text{g}/\text{mL}$) a los cinco días y la menor expresión la presentaron los cultivos de células BO a los 10 días ($0,516 \mu\text{g}/\text{mL}$) y LP a 2 los dos días ($0,562 \mu\text{g}/\text{mL}$) con un ($p < 0.01$).



Gráfica 17. Cuantificación de la proteína (NT-3) en medios condicionados. La figura muestra las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de la proteína NT3 presentes en los medios de cultivo de las CGEO de BO y LP los días (2,5,10 y 30) de cultivo primarios. En todas los días de evaluación la expresión del factor NT-3 fue mayor en los medios de las células LP. Mostrando una mayor concentración de LP ($21,1 \mu\text{g/mL}$) y de BO ($4,83 \mu\text{g/mL}$) al quinto día del cultivo con un ($p < 0.01$).

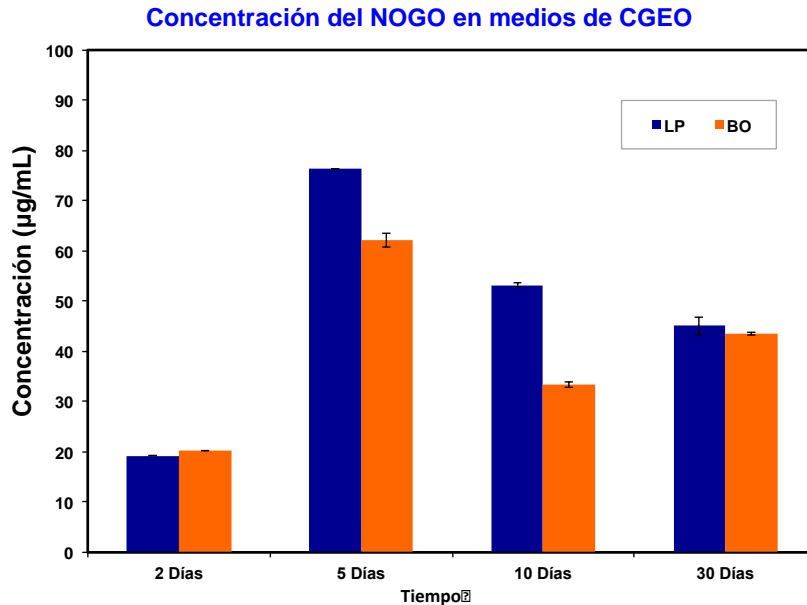


Gráfica 18. Cuantificación de la proteína (NT-4) en medios condicionados. La figura muestra las concentraciones ($\mu\text{g/mL}$) de la proteína NT4 presentes en los medios de cultivo de las CGEO de BO y LP los días (2,5,10 y 30) de cultivo primario. Mostrando una mayor concentración de BO ($2,74 \mu\text{g/mL}$) y de LP ($1,61 \mu\text{g/mL}$) al quinto día del cultivo con un ($p < 0.01$).



Proteínas inhibidoras en medios de cultivos de las CGEO

Gráfica 19. Cuantificación de la proteína (NOGO-A) en medios condicionados. La figura muestra las concentraciones en ($\mu\text{g/mL}$) de la proteína NOGO-A presentes en los medios de cultivo de las CGEO obtenidas de BO y LP en los días (2, 5, 10 y 30) de cultivo primario. Mostrando una mayor concentración de LP (76,4 $\mu\text{g/mL}$) y de (62,1 $\mu\text{g/mL}$) para BO al día quinto del cultivo celular con un ($p < 0.01$).



Gráfica 20. Cuantificación de la proteína MAG en medios condicionados. La figura muestra las concentraciones en ($\mu\text{g/mL}$) de la proteína MAG presentes en los medios de cultivo de las CGEO obtenidas de BO y LP en los días (2, 5, 10 y 30) de cultivo primario. Mostrando una mayor concentración en BO (44,76 $\mu\text{g/mL}$) al quinto día del cultivo y de (32,56 $\mu\text{g/mL}$) para LP al segundo día del cultivo celular con un ($p < 0.01$).

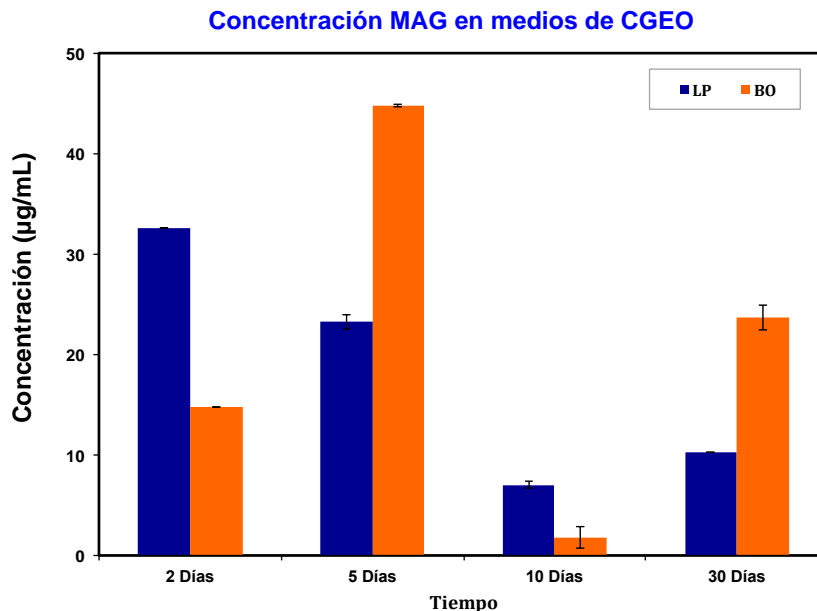


Tabla 9. Días y valores más altos de la cuantificación de proteínas facilitadoras e inhibidoras presentes en medios condicionados de las CGEO.

Proteína	Día	BO	Día	LP
aFGF	5	1,60 µg/mL	10	2,40 µg/mL
NT-3	5	4,83 µg/mL	5	21,1 µg/mL
NT-4	5	2,74 µg/mL	5	1,61 µg/mL
NOGO-A	5	62,10 µg/mL	5	76,4 µg/mL
MAG	5	44,7 µg/mL	2	32,5 µg/mL

Para todas las concentraciones de los factores estimuladores e inhibidores se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre los tipos de células BO y LP y el tiempo, esto significa que algunas de las interacciones presentaron una expresión de los factores estimuladores e inhibidores mucho más alta o mucho menor a la esperada (Tabla 10).

Tabla 10. Niveles de significancia (p) de la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) en los medios de cultivos de CGEO.

FACTOR	MEDIO CGEO	TIEMPO	MEDIO - TIEMPO
aFGF	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
NT3	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
LOGNT3	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
NT4	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
NOGO	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$
MAG	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$

- $p < 0.01$: Diferencias altamente significativas
- $0.01 < p \leq 0.05$: Existen diferencias significativas
- $P > 0.05$: No existen diferencias significativas

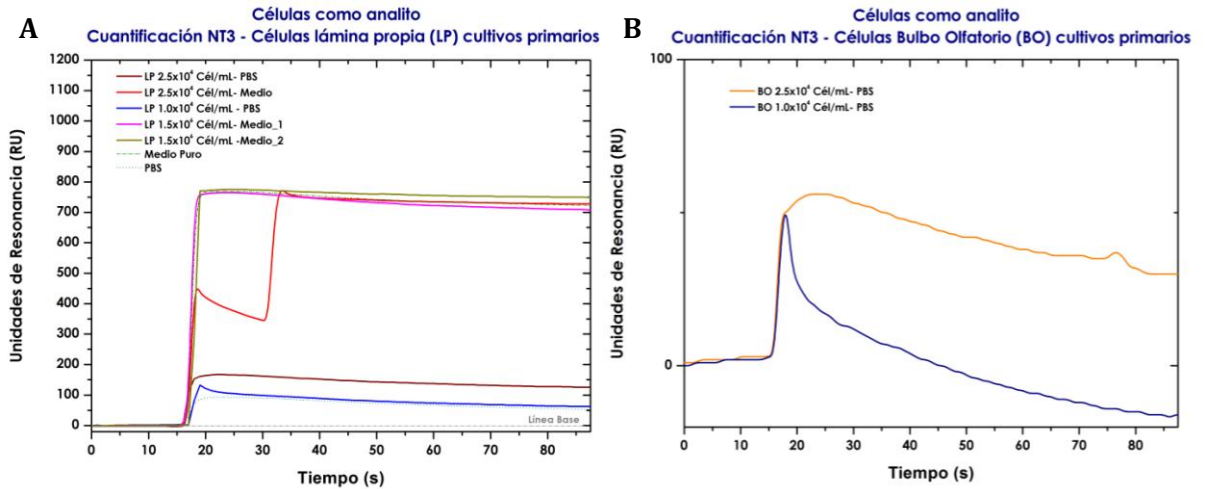
Se presentó una alta similitud entre las repeticiones en cada uno de los tiempos evaluados para los dos tipos de células, tomando en cuenta que sólo se encontraron coeficientes de variación por encima del 10% para los factores NT-4 de células LP (10,5%) y BO (16,1%) a los diez días para MAG en células de BO (71,9%) a los diez días y para aFGF en células de LP (10,7%) a los dos días y BO (16,3%) a los cinco días (Tabla 10; Anexo 1, 2,3,4,5 y 6), esta baja variabilidad entre las repeticiones de una misma interacción (células y Tiempo) es un indicativo del alto grado de estandarización de las técnicas de cultivo y cuantificación de la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) de neuroregeneración presentes en cultivos de CGEO y sus medios condicionados.

3.5. Células como analito- Cultivos primarios de CGEO

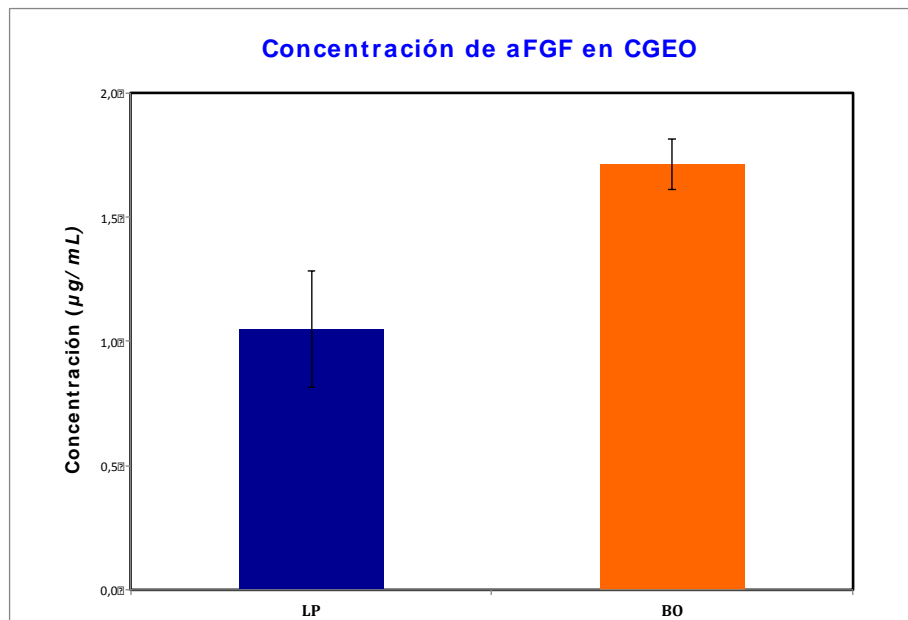
Para la estandarización de los ensayos de cuantificación donde se utilizan las células de CGEO como analito, se realizaron diferentes diluciones (1.0×10^4 , 2.5×10^4 y 1.0×10^5 y 5.0×10^5 células/mL PBS), para encontrar la mejor respuesta en RU dentro del sistema biosensor. Así mismo, se inyectaron blancos como PBS 1X y como control medio puro (DMEM-12). Los resultados evidenciaron que el medio de cultivo causa una interacción inespecífica y ruido de fondo en el equipo, haciendo que no se pudiera cuantificar las células. Por lo anterior, se procedió a diluir las células en PBS 1X evidenciando que este buffer no interfiere con los resultados de cuantificación y se pueda sustraer la diferencia en la respuesta mostrada por el buffer (0.5 RU) de los datos de cuantificación directa de las células. Los ensayos se hicieron tanto para las células de BO y LP.

Las diluciones celulares 1.0×10^5 y 5.0×10^5 células/mL PBS, mostraron interacciones inespecíficas debido a una alta concentración celular que satura el microfluído produciendo la formación de artefactos sobre la superficie sensora. Se observa que en concentraciones más diluidas las curvas de asociación son más claras, pudiendo determinar la RU de forma más precisa. La concentración adecuada donde se observó una mayor respuesta es la dilución celular de 2.5×10^4 células/mL PBS y fue la utilizada para inyectar individualmente sobre cada uno de los canales donde se encontraban inmovilizados los anticuerpos. La gráfica 21, muestra los resultados de optimización de la cuantificación de las CGEO como analito.

Gráfica 21. Optimización de la cuantificación de las células CGEO como analito. **A.** Cuantificación de NT-3 en las células de LP como analito a diferentes concentraciones celulares, PBS, y DMEN. **B.** Cuantificación de NT-3 en las células de BO como analito

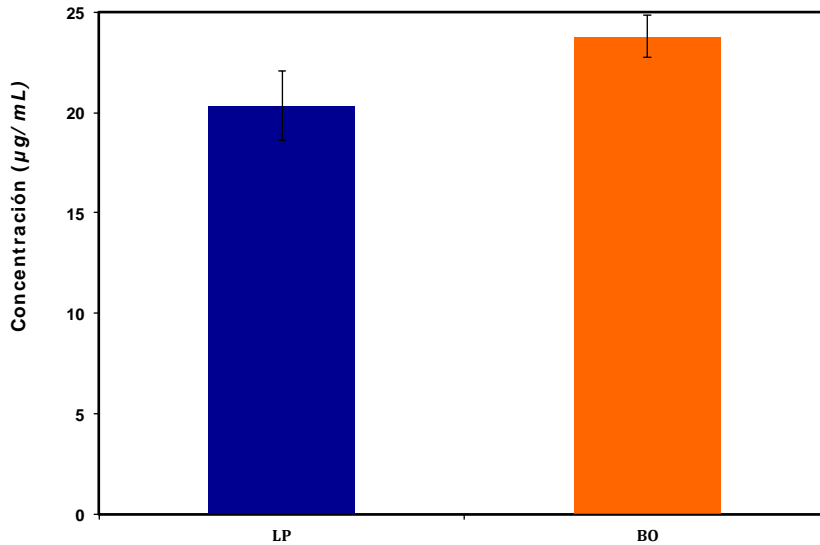


Gráfica 22. Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de aFGF, se observó una mayor concentración de este factor en células BO de (1,71 µg/mL) y en LP de (1,05 µg/mL) con un ($P > 0.05$).



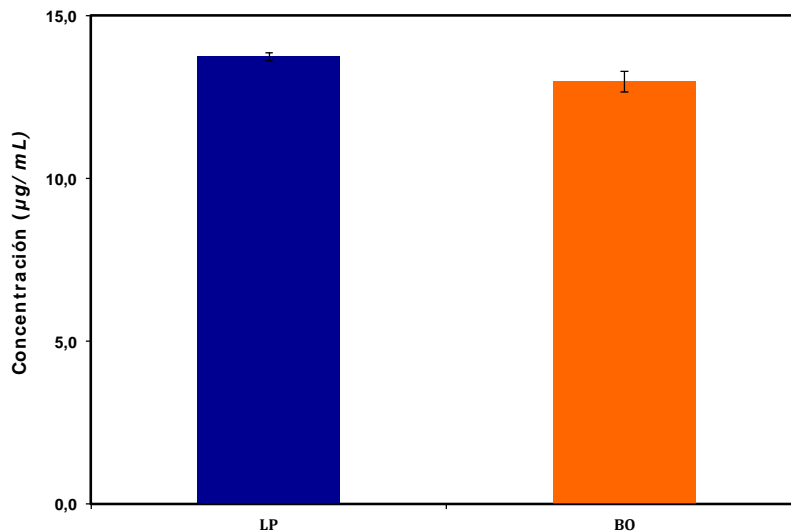
Gráfica 23. Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación NT-3, se observó una mayor concentración de este factor en células BO de (23,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en LP de (20,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un ($P>0.05$).

Concentración de NT-3 en CGEO - Celulas como analito

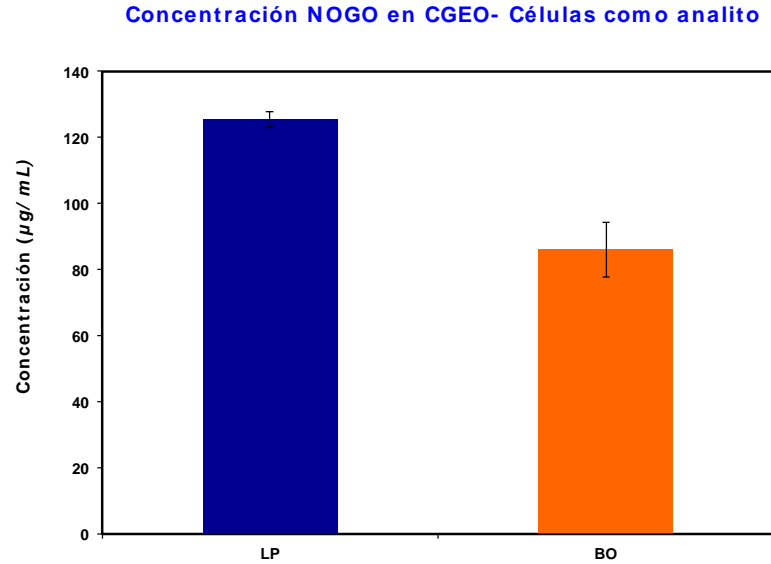


Gráfica 24. Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación NT-4, se observó una mayor concentración de este factor en células LP de (13,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en BO de (12,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un ($P>0.05$).

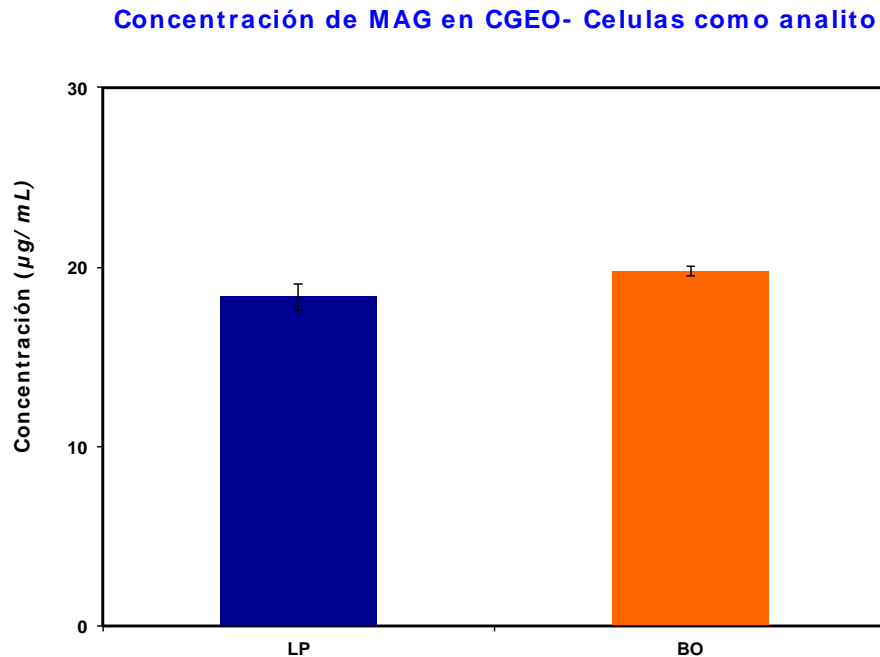
Concentración de NT- 4 en CGEO- Celulas como analito



Gráfica 25. Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación de NOGO, se observó una mayor concentración de este factor en células LP de (125,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en BO de (86,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un ($p < 0.05$).



Gráfica 26. Cuantificación de células CGEO como analito. Cuantificación MAG, se observó una mayor concentración de este factor en células BO de (19,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en LP de (18,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con un ($P > 0.05$).



Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las células LP y BO en la expresión del factor inhibidor NOGO-A, la expresión de este factor superó en las células LP al de las células BO en 39,474 $\mu\text{g/mL}$. Los demás factores presentaron concentraciones similares en los dos tipos de células primarias con un ($P > 0.05$), pero aunque, no se presentaron diferencias estadísticas significativas, se observó que la expresión de los factores aFGF, NT-3 y MAG fue mayor en las células BO y para los factores NT-4 y MAG la concentración fue mayor en las células LP (Tabla 11; Grafica 21 -26).

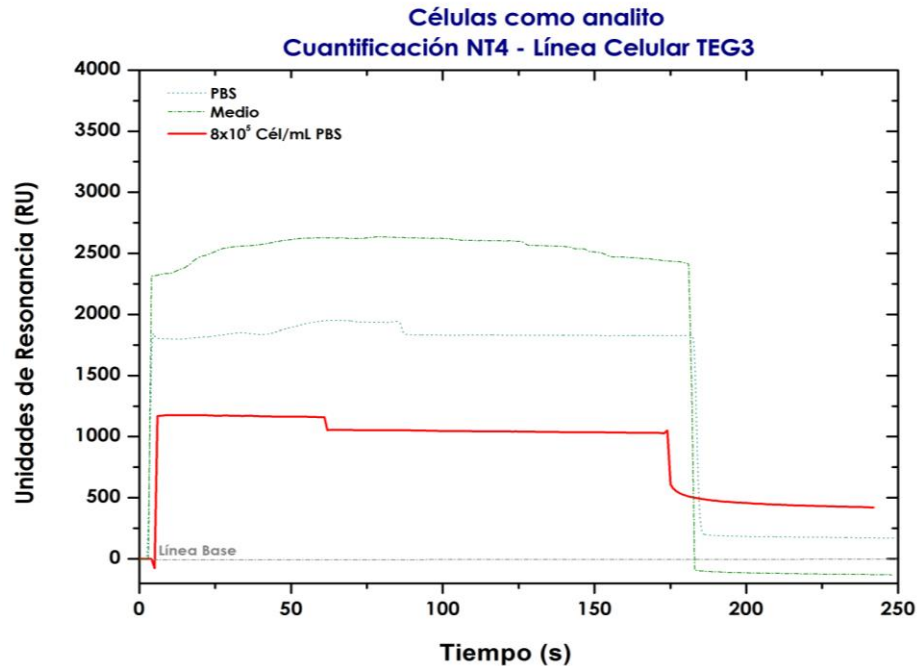
Tabla 11. Estadística descriptiva y niveles de significancia (p) de la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) en CGEO.

FACTOR	CÉLULA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	%COEFICIENTE. VARIACIÓN	SIGNIFICANCIA (P)
aFGF	LP	1,050	0,235	22,358	0,07
	BO	1,713	0,102	5,944	
NT3	LP	20,341	1,735	8,527	0,14
	BO	23,775	1,040	4,375	
NT4	LP	13,726	0,117	0,850	0,08
	BO	12,962	0,313	2,417	
NOGO-A	LP	125,523	2,436	1,941	0,02
	BO	86,049	8,323	9,672	
MAG	LP	18,351	0,738	4,019	0,12
	BO	19,770	0,254	1,284	

3.6. Células como analito- Cultivos de CGEO transfectadas– TEG3

Al igual que para el caso de cuantificación de CGEO como analito, se hicieron cuantificación de células CGEO transfectadas. Se hizo optimización de la cuantificación, inyectando una densidad celular de 8×10^5 células/mL PBS como concentración óptima ya que se observaron curvas de asociación y disociación claras. Se utilizó PBS 1X como control negativo y medio puro DMEM como blanco.

Grafica 27. Cuantificación de NT-4 en CGEO immortalizadas TEG3 a una concentración de 8×10^5 como analito. Inyección de PBS. Inyección de medio condicionado.



Gráfica 28. Cuantificación proteínas(aFGF, NT-3, NT-4, NOGO-A, MAG) presentes en CGEO immortalizadas TEG3 como analito. La mayor concentración de factores proteicos correspondió para NT3 y NOGO con valores de $1,24 \mu\text{g/mL}$ y $3,35 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

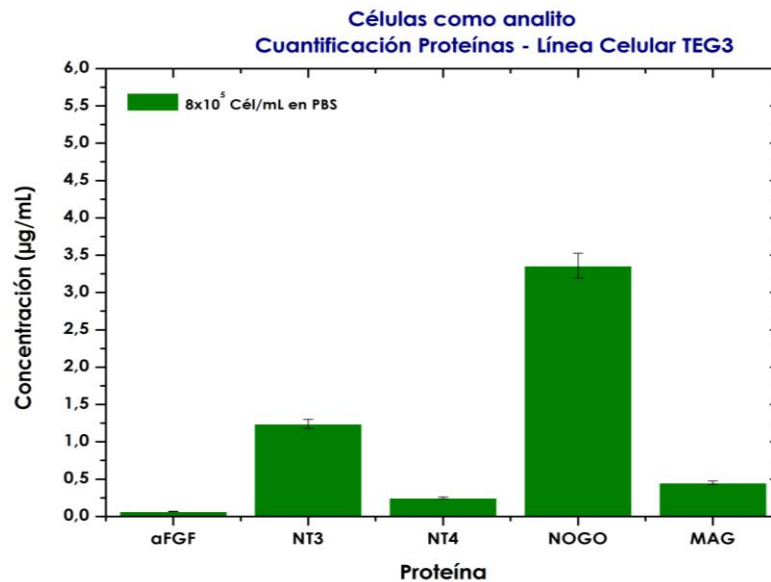


Tabla 12. Concentraciones de cada factor (aFGF, NT-3, NT-4, NOGO-A y MAG) en los medios de cultivo de las CGEO, las CGEO de cultivos primarios y la línea celular TEG3 como analito.

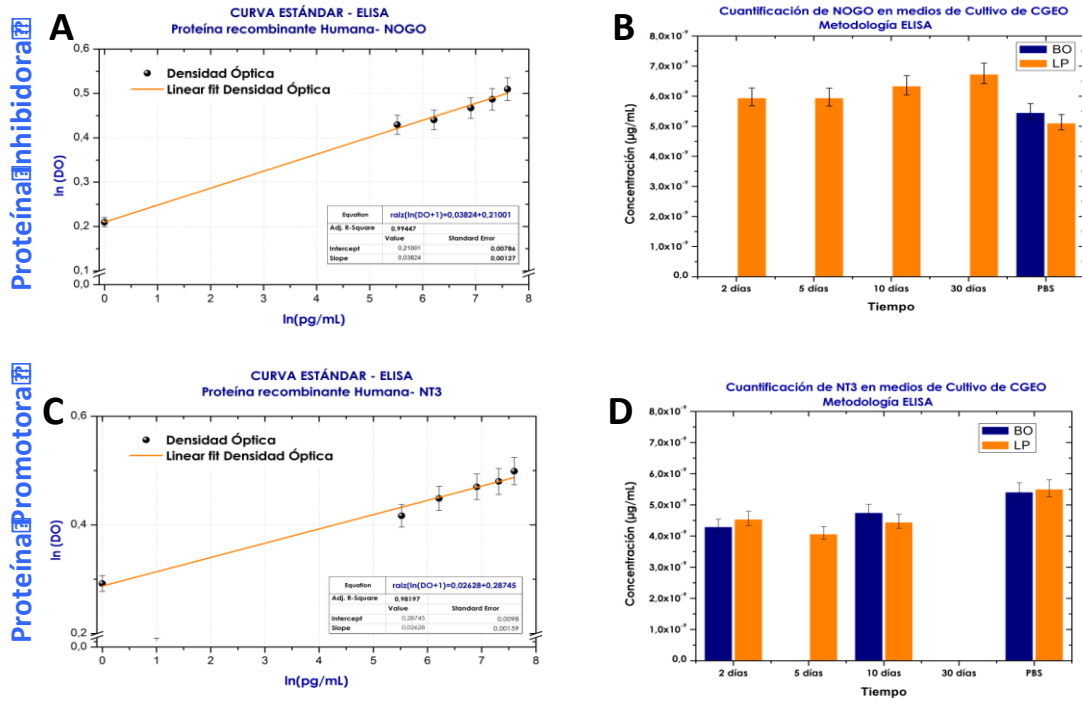
Factores	Días	Medios Condicionados		Cultivos primarios CGEO		TEG3
		LP	BO	LP	BO	BO
aFGF	10	2,40 $\mu\text{g/mL}$		1,05 $\mu\text{g/mL}$	1,71 $\mu\text{g/mL}$	0,067
	5		1,60 $\mu\text{g/mL}$			$\mu\text{g/mL}$
NT-3	5	21,1 $\mu\text{g/mL}$	4,83 $\mu\text{g/mL}$	20,3 $\mu\text{g/mL}$	23,7 $\mu\text{g/mL}$	1,24 $\mu\text{g/mL}$
NT-4	5	1,61 $\mu\text{g/mL}$	2,74 $\mu\text{g/mL}$	13,7 $\mu\text{g/mL}$	12,9 $\mu\text{g/mL}$	0,24 $\mu\text{g/mL}$
NOGO	5	76,43 $\mu\text{g/mL}$	62,1 $\mu\text{g/mL}$	125,5 $\mu\text{g/mL}$	86,0 $\mu\text{g/mL}$	3,35 $\mu\text{g/mL}$
MAG	2	32,5 $\mu\text{g/mL}$		18,3 $\mu\text{g/mL}$	19,7 $\mu\text{g/mL}$	0,45
	5		44,7 $\mu\text{g/mL}$			$\mu\text{g/mL}$

Objetivo 3. Validar la metodología de cuantificación del biosensor mediante la aplicación del método de Elisa.

3.7. Validación de la metodología prueba ELISA

Para comparar los resultados obtenidos con el biosensor, se utilizó una técnica de inmunoensayo de ELISA para cuantificar medios de cultivo de CGEO. Teniendo en cuenta las concentraciones más altas obtenidas con SPR se escogieron dos factores proteicos: NT-3 (Promotor) y NOGO-A (Inhibidor) como proteínas para realizar los ensayos ELISA. Los resultados de concentración obtenidos por medio de ELISA e interpolados en las curvas de calibración propias realizadas en el ensayo, no muestran un resultado estadísticamente significativo para las dos proteínas, ya que los resultados obtenidos del blanco (PBS 1X) son muy similares a los obtenidos para los medios de cultivo de CGEO en los distintos días. Por lo anterior no se puede hacer una comparación entre las dos metodologías.

Grafica 29. **A.** Curva estándar para la proteína recombinante NOGO- A, **B.** Cuantificación de la proteína NOGO- A en medios de cultivos de las CGEO, **C.** Curva estándar para la proteína recombinante humana Neurotrofina 3 NT-3, **D.** Cuantificación de Neurotrofina 3 NT-3 en medios de cultivos de CGEO. Realizado por medio de la prueba ELISA



4. Discusión

En la búsqueda de la recuperación funcional en lesiones medulares, se han probado diversas estrategias terapéuticas, entre ellas se han evaluado, en modelos *in vivo* e *in vitro* las diferencias biológicas de la CGEO tomadas de diferentes tejidos olfatorios y usadas en distintos modelos animales con lesión medular, mostrando cambios progresivos funcionales en el grupo que utilizaron células de la lámina y bulbo olfatorio, revelando así una disminución en el tamaño de la cavidad de la lesión en la médula espinal (Richter et al., 2005). Adicionalmente, Kubasak y colaboradores probaron el trasplante de CGEO en ratas con sección completa y demostraron que el trasplante de CGEO induce recuperación. Por esta razón, el trasplante de CGEO tiene un resultado positivo en la recuperación funcional de los animales trasplantados y este resultado es dependiente del tiempo post trasplante (Kubasak et al., 2008). Estas variaciones, también depende del modelo de lesión, el tiempo de lesión, el tipo de célula trasplantada, la edad de los animales y finalmente si los trasplantes son de terapia celular o trasplantes combinados de células más factores neurotróficos. Es así como, Gómez, 2008 y Botero, 2015 han usado como blanco terapéutico, en ratas con lesión medular completa en fase aguda y crónica, una combinación de factor aFGF (factor de crecimiento fibroblástico ácido), FG (Goma de Fibrina) y CGEO en suspensión. Esta combinación obtuvo resultados prometedores, logrando mejoría significativa de la función locomotora (Gómez, 2009; Botero, 2015). Por esta razón, la posibilidad de recuperar una función motora en el campo neurológico, representa un reto biológico y una aplicación en la medicina translacional.

Las CGEO tiene como función proveer un medio favorable para el desarrollo y crecimiento de axones sensitivos que se originan del EO y realizan su sinapsis funcionales dentro del bulbo olfatorio del primer par craneal, envolviendo, acompañando y guiando los axones desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo. (Forni et al., 2011). Por otro lado, las CGEO son las responsables de la sinapsis de los axones sensitivos con las

células en los glomérulos del BO, tomando en cuenta que acompañan los paquetes de axones y simultáneamente los envuelve por medio de prolongaciones citoplasmáticas, actuando como un aislante para evitar el contacto con factores inhibitorios propios del SNC, que restringen el crecimiento axonal (Doucette, 1990).

Las células anteriormente mencionadas, muestran tanto como; en su desarrollo, morfología, inmunocitoquímica y propiedades funcionales diferentes a otros tipos celulares de glía y, por esto, son un único tipo celular no clasificado dentro de cualquier población celular glial (Lakatos et al., 2003). Del mismo modo, las CGEO producen factores neurotróficos y neuríticos que promueven y median la supervivencia neuronal y la elongación axonal (Chuah and West, 2002).

A nivel molecular, no es claro el papel de las CGEO en el crecimiento axonal. Sin embargo, se conoce que estas células expresan proteínas que influyen en dicho proceso. En otros estudios se ha evidenciado que las CGEO secretan moléculas de adhesión promotoras de crecimiento axonal como; L1, Laminina, E-NCAM (molécula de adhesión celular neuronal embrionaria), Fibronectina, Nexina derivada glial, Colágeno tipo IV y S100 β (proteína del citoesqueleto asociada a calcio) (Farmer et al., 1990; Van Eldik et al., 1991; Chuah et al., 1995; Franceschini and Barnett, 1996; Smale et al., 1996) y pueden actuar como sustratos favorables para el crecimiento axonal ejerciendo un efecto quimiotrópico (Doucette, 1996).

Las CGEO también se caracterizan por secretar neurotrofinas como el factor de crecimiento de nervios (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF) y las neurotrofinas NT-3 y NT-4 (Franceschini and Barnett, 1996; Ramon-Cueto et al., 1998; Richter et al., 2005). Además, Santos-Silva en el 2007 menciona la presencia de aFGF en cultivos disociados de mucosa olfatoria de rata embrionaria estimulando el crecimiento de los procesos en las CGEO (Santos-Silva et al., 2007) y en cultivos enriquecidos de estas células de rata neonatal, el bFGF provocó un aumento de tres veces en la proliferación (Chuah and Teague, 1999). Otro estudio mostró que el efecto del aFGF era dependiente de proteoglicanos heparina sulfato presentes en el cultivo aFGF y que requiere de un proteoglicano que se añaden al medio de cultivo (Key et al., 1996). Por otro lado, Roet y Verhagen, recientemente reportan la presencia de moléculas de la matriz extracelular

que incluyen CDH2, NCAM1, L1CAM, SERPINE1 y citoquinas que incluyen IL6 y CX3CL1 (Roet and Verhaagen, 2014).

Es probable que estas células no sólo secreten factores promotores de regeneración axonal sino que también provean un soporte trófico. Esta hipótesis se soporta *in vitro* ya que se demostró que proveen un sustrato altamente conductivo para el crecimiento axonal de las neuronas sensoriales olfatorias (Graziadei and Graziadei, 1979). Por otro lado, se observó también *in vitro* que las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, mostraba que las CGEO mantienen un sustrato favorable para la elongación axonal neuronal y actúan sobre los axones ejerciendo un efecto quimiotrópico (Doucette, 1996).

Por lo tanto, conocer las características biológicas y funcionales de las CGEO ha promovido el desarrollo de diversos estudios donde se han vinculado estas células como posibles elementos dentro de una estrategia terapéutica para lesiones SNC. (Ramon-Cueto et al., 1998). Sugiriendo que estas células juegan un papel muy importante como mediadoras o facilitadoras de la reconexión efectiva de los axones seccionados. Además, la producción de diferentes moléculas favorables para la regeneración axonal y la aparente facilidad de las CGEO de penetrar en el SNC y de interactuar positivamente con la astrogliá, podrían ser características importantes a favor de la utilización de las CGEO (Barnett and Chang, 2004).

Por otro lado la línea celular TEG-3, línea clonal de CGEO presentó, células con una morfología similar a los cultivos primarios de las CGEO aunque con mayor longitud en sus neuritas. En la caracterización por citometría de flujo mostró para la expresión de P75^{NTR} de 24.4% y para GFAP de 87.9%. En la citometría de flujo de la línea clonal los resultados obtenidos coincidieron con los esperados reportados en la literatura (Moreno-Flores et al., 2006 2003).

Por todo lo anterior y teniendo en cuenta que los mecanismos indirectos tienen que ver con la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas y con la activación de otras células como glía y de CS (Au et al., 2007), surgió la necesidad de evaluar los factores facilitadores e inhibidores por medio de biosensores, específicamente SPR que permite un análisis cuantitativo de concentraciones terapéuticas de proteínas tomando en cuenta

que evalúan interacciones directas entre: proteínas y ligando, en la dinámica, en la naturaleza de uniones y la cinética de afinidad de unión, además en la especificidad y selectividad de los targets (Ziemba et al., 2008). De tal forma, esta evaluación permite dar un soporte para el análisis de procesos biológicos, en este caso en particular, de procesos de neuroregeneración. Así mismo, da a conocer la liberación y expresión de proteínas farmacológicas presentes en células, cultivos celulares y medios condicionados. Teniendo en cuenta que los biosensores pueden ser utilizados para monitorear biomarcadores importantes para el diagnóstico de enfermedades o pronóstico de una terapia farmacológica, este juega un papel significativo ya que permite entender el rol de las proteínas involucradas en la evolución de una enfermedad o en procesos de neuroregeneración.

Los análisis por medio de SPR pueden involucrar diferentes estrategias de interacción, proteína-péptido, proteína-DNA, antígeno-anticuerpo, proteína-lípido (Graphpad, 1998). En nuestra investigación se eligió la estrategia de anticuerpo anti-factor y factor recombinante. Esto permite una interacción específica entre la región variable del anticuerpo y la proteína recombinante. Sin embargo, otros estudios muestran unión a proteínas recombinantes con sus receptores específicos, siendo otra alternativa para estudiar interacciones específicas entre dos entidades biológicas.

En cuanto a la inmovilización de biomoléculas sobre la superficie sensora este es un paso esencial para el éxito de un análisis por medio de biosensores. Las características a ser consideradas para los procedimientos de inmovilización óptima de bioreceptor son: I. La retención de actividad biológica para el analito después de la inmovilización. II. La compatibilidad entre la actividad de unión y rango de detección del analito. III. La cantidad de bioreceptor inmovilizado (para evitar hidrancia estérica). IV. La reproducibilidad de inmovilización (para asegurar reproducibilidad de resultados) y finalmente V. La regenerabilidad de la superficie biosensora, definida como: (disociación ligando-receptor sin compromiso de la actividad biológica del ligando.) (Mariani and Minunni, 2014).

Uno de los aspectos fundamentales de esta investigación, además de los cultivos de CGEO, fueron los ensayos de preconcentración en donde los anticuerpos son diluidos en diferentes buffers de inmovilización que varían por media (0.5) o una unidad (1.0) de pH.

En este caso un pH de 4.5 da una rápida y alta preconcentración, produciendo enlace covalente sobre la superficie sensora por el pH. En otros casos donde no se da el enlace, el pH de inmovilización debe ser incrementado. Si la inmovilización es imposible, otro método de inmovilización debe ser considerado (Bustos, 2010).

Del mismo modo, para la aplicabilidad a matrices reales, la química de inmovilización debe ser optimizada para prevenir interacciones no específicas sobre los componentes de la superficie de la matriz (por ejemplo, proteínas en sangre, suero, etc.). En este estudio, para prevenir la adsorción de biomoléculas no específicas sobre la superficie sensora del SPR se utilizó una solución de Clorhidrato de Etanolamina a un pH de 9.5.

Debido a que la naturaleza de inmovilización de los ligando (anticuerpo) es de carácter proteico, se eligió la estrategia de inmovilización vía amino, ya que esta permite la formación de un enlace covalente amino entre los grupos amino de las proteínas y los grupos carboxílicos, mediante la activación con la solución NHS/EDC. Esta vía química, favorece una unión rápida y de orientación de los bioreceptores, para facilitar la unión de las proteínas recombinantes a los sitios de la región variable del anticuerpo.

Otras estrategias, como monocapas ensambladas (Muñetón et al., 2001), estreptavidina-biotina o por lípidos, usualmente no son las vías adecuadas para anticuerpos o proteínas. Los resultados mostraron una cantidad de inmovilización adecuada con la naturaleza proteica ya que fueron establecidas las condiciones de pH de acuerdo con su punto isoeléctrico (Ver graficas de la 6 a la 10). Resultados de inmovilizaciones mayores a 1000 RU son aceptables de acuerdo con la densidad de inmovilización por milímetro cuadrado de superficie sensora. Estudios recientes han revelado que la metodología de SPR fue estandarizada para la cuantificación de algunas proteínas. Sin embargo dicha metodologías encontradas no se utilizaron para todas las proteínas analizadas en esta investigación. En el caso de aFGF, estudio previo evaluado mediante SPR la importancia de la unión de los grupos heparina sulfato a este factor de crecimiento, ya que regula la angiogénesis, neovascularización en heridas (Wu et al., 2003). Battaglia et al en el 2005., cuantificaron las citoquinas con el uso de SPR (IL-6, IL-4 y TNF-alfa) involucradas en regeneración (Battaglia et al., 2005) . Otros estudios con este biosensor de tipo óptico, ha evaluado el papel de factores neurotróficos derivados como (GDNF) expresados por células gliales y sus interacciones en la inducción del crecimiento de neuritas e

identificación de los sitios de unión por moléculas de adhesión neuronal celular (NCAM), encontrando su sitio de unión (Nielsen et al., 2009). Sin embargo, nuestra investigación presenta un estudio novedoso de cuantificación de proteínas estimuladoras e inhibidoras de células de la glía envolvente olfatoria tanto *in vitro* como *in vivo* por medio del uso de un biosensor de tipo óptico en medios condicionados de CGEO, en las CGEO como analito y en las TEG3, proporcionando como resultado la determinación de la concentración de estas proteínas.

Cuantificación de proteínas facilitadoras e inhibidoras de regeneración axonal presentes en medios condicionados de CGEO

Para los cultivos primarios de las CGEO se utilizó el método de adhesión diferencial el cual tiene como fundamento que las células cultivadas poseen diversas propiedades de unión a diferentes sustratos. De acuerdo con esto una vez sembrada las células los fibroblastos se adhieren a los pozos de cultivo dejando la mayoría de los astrocitos y CGEO en el sobrenadante. Al transferir el sobrenadante a otras cajas de cultivo y dejarlas incubar durante 24 h, se permite la unión de los astrocitos mientras que las CGEO permanecen en suspensión, ya que éstas tienen un tiempo de adherencia de 96 h post cultivo y, por ello, se siembran después de este tiempo en cajas cubiertas con poli-L-Lisina. Posteriormente se dejaron durante 48 horas más; este método ha reportado una pureza del 93% (Nash et al., 2001). En esta investigación los cultivos primarios se realizaron basados en este protocolo para células de BO y LP mostrando resultados con un alto porcentaje de pureza similar a los reportados por (Nash et al., 2001). Se obtuvo para cultivos de BO un 69% de pureza de células marcadas para p75^{NTR+} y de LP un porcentaje de pureza de 87.5%. Adicionalmente, morfológicamente se confirma el fenotipo intercambiable y heterogéneo de estas células.

Dentro de las proteínas facilitadoras se encuentra el factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), definido como un polipéptido de 18 Kilodaltons (KDa) que se ha conservado a través de las especies. Es producido por diferentes tipos celulares, incluyendo fibroblastos, osteoblastos, macrófagos, neuronas, células epiteliales; actuando como un potente mitogénico para las células endoteliales y el músculo liso (Tsai et al., 2008). Su función es mantener la estabilidad de los diferentes tejidos del

organismo, a través de los mecanismos de: 1. Proliferación celular 2. Diferenciación celular 3. Quimiotaxis 4. La producción de la sustancia extracelular en el SNC y 5. Como factor estimulante que promueve efectos significativos de regeneración hasta neuronas a blanco (Alston et al., 2007; Tsai et al., 2008). Por otro lado, algunos estudios han demostrado su efecto para incrementar la sobrevivencia neuronal, mejorar la capacidad de proliferación de neuronas maduras y la recuperación funcional de ratas con lesión medular, confirmado que el factor aFGF promueve la regeneración axonal (Cheng et al., 1996). En este estudio se observó que, en los medios de cultivos de las CGEO, hay una mayor concentración en los medios de LP en los días 5 (pase 3) y 10 (pase 5) de 1.70 $\mu\text{g/mL}$ y 2.40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y para BO los valores encontrados fueron de 1.60 $\mu\text{g/mL}$ en el día 5 y 1.04 $\mu\text{g/mL}$ en el día 5 (ver Grafica 16 y Tabla 9).

Además, otras proteínas conocidas como facilitadoras de regeneración neuronal, son las neurotrofinas; definidas como una familia de proteínas estrechamente relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional, que incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), la Neurotrofina-3 (NT-3), la Neurotrofina-4 (NT-4) (Serrano-Sanchez and Diaz-Armesto, 1998). Las cuales promueven crecimiento axonal, activando receptores tirosina kinasa, que activan proteínas G pequeñas como Ras, Rap-1 y Cdc-42 (Huang and Reichardt, 2003) y Neurotrofina 5 (NT-5) (Serrano-Sanchez and Diaz-Armesto, 1998) más recientemente la Neurotrofina-6 (NT-6) y Neurotrofina -7 (NT-7) (Ramos-Quiroga et al., 2014). En este estudio de cuantificación se pudo evidenciar que dentro de los factores facilitadores, la mayor concentración obtenida correspondió a NT-3, en los medios condicionados, tomados al tercer pase que corresponde al día quinto del cultivo celular con una concentración de 21.1 $\mu\text{g/mL}$ para LP y para BO de 4.83 $\mu\text{g/mL}$ con ($p < 0,01$).

Por todo lo anterior, cabe destacar que estudios previos muestran la importancia de NT-3 que es expresada en moto neuronas y es liberada constitutivamente dentro de la vecindad de la sinapsis entre la moto neurona y la fibra nerviosa (Jones et al., 2001). Otros estudios, como los de Roskams y colaboradores identificaron la presencia de NT-3 en epitelio olfatorio de rata, probando que inducía expresión de *cFos* en cultivo de neuronas olfatorias y a su vez actúan en el desarrollo y crecimiento de los axones olfatorios mostrando además, que producían BDNF, NT-3 y NT-4 como las principales neurotrofinas encargadas de la sobrevivencia y regeneración de neuronas (Roskams et al., 1996).

Así mismo, en un estudio previo se demostró que la liberación de neurotrofinas puede promover la elongación axonal y a su vez la conexión de motoneuronas después de un daño de fibras nerviosas periféricas y de lesión medular, por medio de la administración exógena de NT-3, observándose mejoras en las propiedades de las motoneuronas durante el desarrollo y/o después de una lesión. (Mackay-Sima and Chuahb, 2000).

Al observar los resultados obtenidos en el biosensor de los medios de cultivos de CGEO en cuatro pases del cultivo celular al primero, tercero, quinto y quinceavo pase correspondiente a los días (2, 5, 10 y 30) del cultivo. Se evidenció que NT-3 en LP y BO fue la proteína facilitadora con mayor concentración con predominio en LP. Aunque existe controversia frente a la presencia de esta proteína en la vía olfatoria primaria, otros autores reportan su presencia en tejido olfatorio (Guthrie and Gall, 1991; Deckner et al., 1993) y en bulbos olfatorios de ratas y ratones, por medio de inmunoensayo.

Estos resultados confirman que NT-3 es transportada al bulbo desde la lámina (Kato-Semba et al., 1998). Lo anteriormente descrito es corroborado por los resultados del presente trabajo encontrando una mayor concentración de NT-3 en LP (21.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en relación con BO de (4.8 $\mu\text{L}/\text{mL}$) en el día 5 en el análisis con el biosensor con un ($p < 0,01$).

Además, se ha demostrado la presencia de otras neurotrofinas, como neurotrofinas NT-4 y NT-5 en epitelio olfatorio y estas están vinculadas con regeneración axonal. (Boruch et al., 2001). Los resultados de esta investigación mostraron la presencia de NT-4 en medios condicionados en mayor concentración para BO de 2.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para LP de 1.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$, al día 5 correspondiente, al tercer pase del cultivo celular con ($p < 0,01$). Sin embargo, la literatura actual no reporta correlaciones biológicas y clínicas para esta proteína, aunque algunos autores la vinculan con muchas de las propiedades características de NT-3. (Mackay-Sima and Chuahb, 2000; Mendell et al., 2001). Por lo anterior, las neuronas olfatorias en cultivo dependen de la presencia de estas neurotrofinas para su desarrollo, supervivencia, diferenciación y maduración. Es así, como durante el desarrollo y después de una extracción del bulbo olfatorio, los axones olfatorios expresan trkB (tirosin kinasa B) y trkC (tirosin kinasa C) y sus respectivos ligando BDNF-NT-4 y NT-3 y por ello se cree que están involucrados en la supervivencia de las neuronas olfatorias regeneradas (Muñetón et al., 2001).

En cuanto a las moléculas inhibitoras que actúan sobre de la neurogénesis produciendo ausencia o disminución de factores neurotróficos y de la pobre capacidad de regeneración axonal de la cicatriz glial, estas se ven influenciados por los factores inhibitoros más reportados como: los asociados a mielina Nogo-A, MAG y OMgp (glicoproteína de oligodendrocitos-mielina) (Cao et al., 2007). MAG fue la primera proteína inhibitoria descrita como una molécula de acción dual que promueve el crecimiento axonal en neuronas en estado de desarrollo y acción inhibitoria en neuronas viejas (Lee and Zheng, 2012). Forma parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas unidoras de ácido siálico que se expresa en los oligodendrocitos en la primera fase de mielinización axonal y está constituido por cinco dominios de inmunoglobulina extracelulares tiene un único dominio transmembranal y una corta cola citoplasmática (Akbik et al., 2012). Con respecto, a la cuantificación en esta investigación de esta proteína inhibitora en los medios condicionados de las CGEO, mostraron una mayor concentración de 44.76 ug/mL en BO que corresponde al tercer pase en el día 5 y en LP una menor concentración de 32.56 ug/mL en el primer pase al día 2 del cultivo celular primario con un ($p < 0,01$).

Otra proteína inhibitoria de neuroregeneración axonal que fue estudiada en este trabajo fue NOGO-A. Esta es una proteína de membrana de 1.163 aminoácidos con un peso molecular de 200 KDa y que se expresa en sistema nervioso de los mamíferos adultos (Schwab, 2004). Formando parte de los genes-retículo que tienen cuatro miembros en mamíferos (RTN1, RTN2, RTN3 y RTN4 o Nogo). El gen RTN4 codifica para tres diferentes proteínas que son Nogo-A, Nogo- B y Nogo-C , siendo Nogo- A expresada por los oligodendrocitos. Por otro lado, se ha encontrado también en el sistema nervioso central; más específicamente en neuronas con bajos niveles de mielina. Muchos estudios han utilizados modelos genéticos mostrando que esta molécula limita la regeneración en el SNC lesionado y que su inhibición mejora la recuperación motora y la reconexión de axones (Akbik et al., 2012). Otros estudios sobre el papel que jugaría esta molécula inhibitoria, muestran que la recuperación de la función motora en ratas con lesión medular trasplantadas con células madre mesenquimales con un RNA de interferencia para silenciar el receptor de Nogo-66; evidenciaron que el número de fibras regeneradas fue significativamente más alto en el grupo trasplantados con las células silenciadas en relación con el grupo tratado con las células no silenciadas (Franceschini and Barnett, 1996). Estos resultados darían pie a una implicación de esta molécula de manera

indirecta en la fisiopatología de la lesión medular. Otra de las razones, por la cual esta investigación cuantificó los valores de dicha proteína presentes en los medios de cultivos de las CGEO vistas como blanco terapéutico, encontrando una mayor concentración en los medios proveniente de LP con una concentración de 76,43 ug/mL y para BO de 62,10 ug/mL en el tercer pase al día 5 del cultivo celular primario ($p < 0,01$).

Llamativamente, las proteínas inhibitoras presentaron mayor concentración en la cuantificación de los medios de cultivo con un mayor predominio de NOGO- A, esto se debe a que la expresión neuronal de NOGO- A está aumentada durante el desarrollo del sistema nervioso en etapa embrionaria, neonatal y disminuye cuando el SN se ha desarrollado (edad adulta) (Schwab, 2004). Basado en lo anterior, el tejido olfatorio aislado para cultivos primarios se obtuvo de ratas neonatales. Existiendo así, una correlación con los datos obtenidos en este estudio que podrían contribuir como estrategia terapéutica en lesiones del SN.

En resumen, las evidencias conducen a pensar que la CGEO expresa varias neurotrofinas y sus receptores, entre las cuales están el aFGF, NT-3 y NT-4 y estas moléculas podrían ser parcialmente responsables de la alta plasticidad en el sistema olfatorio y en los procesos regenerativos mediados por trasplantes de CGEO. Todos estos aspectos sobre las CGEO, nos llevaron a utilizar este tipo celular *in vitro* con el fin de caracterizar la presencia de moléculas estimuladoras e inhibitoras de regeneración axonal expresadas por las células.

Células como analito - Cultivos primarios de CGEO

Este estudio presenta un método diferencial y novedoso para investigar la interacción entre proteínas recombinantes humanas (objetos de estudio) con sus respectivos anticuerpos, mediante el uso de células intactas. Esta aproximación podría ayudar a un análisis funcional de procesos de neuroregeneración o de diagnóstico clínico, dados en un SPR en tiempo real y proveniente de diferentes cultivos primarios y líneas celulares susceptibles a estudiar. Por otro lado, también puede ayudar a entender proceso angiogénicos o en la búsqueda de nuevas proteínas que influyan en la neuroregeneración. Para este propósito las CGEO vivas fueron directamente inyectadas sobre la superficie sensora, donde previamente se habían inmovilizados los anticuerpos.

Así de esta manera, se obtuvo un método de monitoreo de las interacciones entre las proteínas recombinante y los anticuerpos en tiempo real.

Se realizaron evaluaciones por triplicado que permitieron obtener una cuantificación de las proteínas expresadas en la membrana y con el fin de asegurar que los resultados obtenidos no fueron dados por uniones inespecíficas se inyectaron como controles en un canal los blancos el DMEN-12 y PBS 1X. Diferentes concentraciones de cultivos celulares primarios y de la línea clonal fueron evaluadas en orden para optimizar el ensayo de detección al incrementar la densidad celular. Se observó respuestas no específicas, esto fue comparado con el canal de referencia de los blancos (control negativo).

La inyección de las células sobre el canal de referencia produce una baja respuesta la cual corresponde a las agregaciones no específicas de las células sobre la superficie (10% a 15 % de la señal del SPR) de esta manera, la suspensión de la densidad celular óptima para el análisis fue de una concentración de 2.5×10^4 células/mL dando una respuesta adecuada para el desarrollo del análisis. Las respuestas de SPR pueden así mantener un mínimo de señal confiable que permite una clara diferenciación entre interacciones específicas y no específicas. Por otro lado, las asociaciones fueron determinadas en los sensorgramas indicando la confiabilidad de los análisis de SPR para detectar selectivamente interacciones específicas. En la cuantificación y comparaciones de eventos intracelulares las respuestas obtenidas sobre cada uno de los canales fueron normalizadas por la expresión de la señal de SPR de las soluciones blanco como el porcentaje de la máxima respuesta es decir: $[100 \times (\text{SPR}_{\text{signal}}/\text{SPR}_{\text{signal, max}})]$.

Después de definir las condiciones de ensayo se evaluó la reproducibilidad del mismo bajo la misma superficie sensora, tomando como ventaja el monitoreo de interacciones que se pueden hacer sobre superficies reusables. Los agentes de regeneración son diferentes de los utilizados en los ensayos de unión en los medios de cultivos debido a la diferencia de la naturaleza en las células en relación a los factores proteicos, por esta razón se utilizó una solución detergente Sodio Dodecil Sulfato (SDS 0.5%) que permite romper las membranas lipídicas de las células. Finalmente, los datos obtenidos de las RU fueron interpolados en las curvas de calibración pudiéndose obtener una concentración en ug/mL para cada uno de los factores. Los datos presentados muestran

una mayor concentración en las proteínas estimuladores de NT-3 (23.77 $\mu\text{g/mL}$) con ($p > 0.05$) para células BO y en las proteínas inhibidoras una mayor concentración de NOGO-A para LP de (125.5 $\mu\text{g/mL}$) con un ($p < 0.05$).

En cuanto a la línea clonal TEG3, se observa una correlación en magnitud de concentración (misma unidades de cuantificación) comparada con las células de los cultivos primarios de CGEO. Esto sugiere que los resultados encontrados corresponde a la expresión de los factores proteicos sobre la membrana y que interaccionan específicamente con los ligandos respectivos. Así mismo, hay una correlación entre los factores presentes tanto en medios de cultivo y en las células transfectadas, encontrando que para la línea clonal TEG3, NT-3 y NOGO-A tienen los más altos valores de concentración de 1.24 $\mu\text{g/mL}$ y 3.35 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente al igual que en los cultivos celulares de CGEO primarios. Lo anterior, indican dos aspectos relevantes: 1) La presencia de NT3 y NOGO-A juegan un papel importante en los procesos de regeneración y 2) Alta reproducibilidad y sensibilidad de la metodología desarrollada dentro del sistema sensor.

En resumen la metodología SPR permitió monitorear los eventos celulares de manera directa y en tiempo real sin el uso de marcadores y con una alta sensibilidad y especificidad, incrementando así los parámetros de afinidad. Como se ha mencionado a lo largo del texto tanto para los cultivos primarios, sus medios condicionados y la línea clonal, este estudio determino los niveles de expresión y cuantificación de las proteínas estimuladoras e inhibidoras que podrán ser utilizados en lesiones y patologías del SN. No obstante, conocer las cantidades presentes de dichos factores en las células previas al trasplante facilitaría estipular las cantidades, sus concentraciones adecuadas y a su vez el pase del cultivo celular que se utilizaría para ser trasplantada con una mayor eficiencia. Mostrando así la utilidad en el avance del conocimiento de las CGEO y los factores liberados por ellas. Finalmente, lo anterior permitiría ofrecer posibles aplicaciones de estas células y el método usado ya que podrían ayudar al conocimiento de los eventos de neuroregeneración y contribuir a las terapias basadas en target de receptores de membrana.

Finalmente, en la comparación de los resultados obtenidos por ELISA, se observa que para la cuantificación de los medios de cultivo de CGEO, no se observan presencia de

factores proteicos NT-3 y NOGO-A. Lo anterior nos llevaría a pensar que estas proteínas no se encuentran en los medios de cultivo y poniendo en duda lo encontrado por el sistema biosensor. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los biosensores presentan una alta sensibilidad y selectividad para proteínas comparado con ELISA, ya que la densidad de inmovilización del ligando sobre la superficie en SPR, es mucho mayor y la interacción del ligando-analito es más fácil en SPR que en ELISA debido a que la superficie del chip ha sido diseñada para incrementar el área de unión y la señal. Estudios encontrados en la literatura evidencian, que cuantificaciones que se realizaron para medios de cultivo de tejido conectivo artificial autólogo (TCAA), los medios evaluados por ELISA no dieron resultados satisfactorios. Sólo cuando se hubo concentrado los medios, se pudo detectar la presencia de proteínas (Bustos, 2010). En adición, los pretratamientos de la muestra llevados a cabo para el desarrollo de la cuantificación en ELISA, pueden resultar en la pérdida de muestra impidiendo la detección de los factores. Estudios reportados en la literatura, comparando estos dos sistemas han mostrado mayores concentraciones en SPR que en ELISA, sugiriendo que las diferencias pueden estar relacionadas con el pretratamiento de la muestra.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Los cultivos primarios de las CGEO mostraron una capacidad proliferativa que se mantuvo hasta el día 30. Además, en su caracterización por citometría, se confirmó morfológicamente el fenotipo intercambiable y heterogéneo de estas células.
- Las células TGE-3, línea clonal de CGEO presentaron una morfología similar a los cultivos primarios de las CGEO, aunque con mayor longitud en sus neuritas. En la citometría de flujo de la línea clonal los resultados obtenidos coincidieron con los reportados en la literatura.
- Las técnicas de nanotecnología son útiles y válidas para la cuantificación de la concentración de factores estimuladores e inhibidores de neuroregeneración producidos por las CGEO.
- Para la validación del biosensor (SPR), se confrontaron los resultados mediante el método ELISA, concluyendo que el biosensor muestra una mayor sensibilidad para la cuantificación de las proteínas del estudio.
- Se encuentra una correlación de la presencia de NT-3 y NOGO-A en mayor concentración en las tres muestras analizadas: medios de cultivo, células CGEO como analito y células transfectadas TEG3 como analito. Lo anterior indica una alta reproducibilidad, sensibilidad y selectividad de la metodología optimizada dentro del sistema sensor.

- La potenciación de la NT-3 como factor estimulador y la modulación de NOGO-A como factor inhibidor, en CGEO obtenidas de lámina propia neonatales, serían objetivos terapéuticos idóneos en modelos experimentales de neuroregeneración.
- La ejecución de la presente investigación fue de gran utilidad por los siguientes aspectos: (I) Se utilizó tecnología de punta en el campo de la neurociencia básica y clínica que permitirían su aplicabilidad futura en el mejoramiento de la salud de pacientes con lesiones neurales adquiridas y (II) aproximación a los procesos neuroregenerativos en modelos animales para posteriores estudios preclínicos y clínicos mediante la administración de estrategias terapéuticas dirigidas con una concentración conocida de las proteínas anteriormente mencionadas.
- Esta investigación desarrollo la estandarización de una técnica con factores neurotróficos e inhibidores utilizando la nanotecnología de los biosensores.

5.2 Recomendaciones

- Aumentar el número de factores promotores e inhibidores producidos por CGEO tanto en cultivos primarios como en líneas clonales mediante el uso SPR, debido a su alta sensibilidad.
- Desarrollar modelos *in vivo* e *in vitro* para probar los desbalances de las interacciones moleculares de los factores neurotróficos y los inhibitorios de regeneración axonal.
- Establecer un patrón de comparación de estrategia de cuantificación dentro del sistema sensor, utilizando proteínas recombinantes y sus respectivos receptores para evaluar sensibilidad y selectividad.
- Evaluar procesos de regeneración en lesiones celulares *in vitro* tomando como base las concentraciones encontradas en las células trasplantadas.

Anexos:

Anexo 1. Grupos homogéneos de promedios para la expresión del factor aFGF en cultivos de células CGEO.

INTERACCION	MEDIA
BO10	0,516
LP2	0,562
LP30	0,895
BO30	0,901
BO2	1,043
BO5	1,606
LP5	1,702
LP10	2,409

Anexo 2. Grupos homogéneos de promedios para la expresión del factor NT3 en cultivos de células CGEO de ratas Wistar.

BO10	1,766	
BO30	3,111	
BO2	3,851	
LP30	4,205	
BO5	4,831	
LP2	5,073	
LP10	13,093	
LP5	21,113	

Anexo 3. Grupos homogéneos de promedios para la expresión del factor NT4 en cultivos de células CGEO de ratas Wistar.

LP30	0,8885
LP10	0,9245
LP2	1,0475
BO30	1,1790
BO10	1,3700
LP5	1,6095
BO2	2,0710
BO5	2,7455

Anexo 4. Grupos homogéneos de promedios para la expresión del factor NOGO-A en cultivos de células CGEO de ratas Wistar.

INTERACCION	MEDIA
LP2	19,266
BO2	20,165
BO10	33,342
BO30	43,543
LP30	45,041
LP10	53,232
BO5	62,103
LP5	76,438

Anexo 5. Grupos homogéneos de promedios para la expresión del factor MAG en cultivos de células CGEO de ratas Wistar.

INTERACCION	MEDIA	
BO10	1,775	
LP10	7,048	
LP30	10,272	
BO2	14,773	
LP5	23,246	
BO30	23,691	
LP2	32,569	
BO5	44,765	

Anexo 6. Estadística descriptiva para la expresión de los factores estimuladores (aFGF, NT-3 y NT-4) e inhibidores (NOGO-A y MAG) en cultivos de células CGEO de ratas Wistar.

Proteína	Interacción		Media	Desviación típica	Valores obser		Inter de conf del 95%		% Coef. Variación
	Tejido	Tiempo (Días)			Mínimo	Máximo	Lim Inf	Lim sup	
aFGF	LP	2	0,562	0,060	0,519	0,604	0,021	1,102	10,7
		5	1,702	0,050	1,666	1,737	1,250	2,153	3,0
		10	2,409	0,128	2,318	2,499	1,259	3,558	5,3
		30	0,895	0,009	0,888	0,901	0,812	0,977	1,0
	BO	2	1,043	0,016	1,032	1,054	0,903	1,183	1,5
		5	1,606	0,262	1,420	1,791	-0,752	3,963	16,3
		10	0,516	0,004	0,513	0,519	0,478	0,554	0,8
		30	0,901	0,028	0,881	0,921	0,647	1,155	3,1
NT3	LP	2	5,073	0,028	5,053	5,093	4,819	5,327	0,6
		5	21,113	0,109	21,036	21,190	20,135	22,091	0,5
		10	13,093	0,292	12,886	13,299	10,469	15,716	2,2
		30	4,205	0,073	4,153	4,256	3,550	4,859	1,7
	BO	2	3,851	0,012	3,842	3,859	3,742	3,959	0,3
		5	4,831	0,035	4,806	4,856	4,513	5,149	0,7
		10	1,766	0,093	1,700	1,831	0,933	2,598	5,2
		30	3,111	0,178	2,985	3,237	1,510	4,712	5,7
LOGNT3	LP	2	0,706	0,002	0,704	0,707	0,686	0,725	0,3
		5	1,325	0,002	1,323	1,326	1,305	1,344	0,2
		10	1,117	0,010	1,110	1,124	1,028	1,206	0,9
		30	0,624	0,008	0,618	0,629	0,554	0,693	1,2
	BO	2	0,586	0,001	0,585	0,586	0,579	0,592	0,1
		5	0,684	0,003	0,682	0,686	0,659	0,709	0,4
		10	0,247	0,023	0,230	0,263	0,037	0,456	9,5
		30	0,493	0,025	0,475	0,510	0,270	0,715	5,0
NT4	LP	2	1,048	0,012	1,039	1,056	0,939	1,156	1,1
		5	1,610	0,013	1,600	1,619	1,489	1,730	0,8
		10	0,925	0,097	0,856	0,993	0,054	1,795	10,5
		30	0,889	0,019	0,875	0,902	0,717	1,060	2,1
	BO	2	2,071	0,016	2,060	2,082	1,931	2,211	0,8
		5	2,746	0,114	2,665	2,826	1,723	3,768	4,1
		10	1,370	0,221	1,214	1,526	-0,612	3,352	16,1
		30	1,179	0,020	1,165	1,193	1,001	1,357	1,7
NOGO	LP	2	19,266	0,081	19,208	19,323	18,535	19,996	0,4
		5	76,438	0,426	76,136	76,739	72,607	80,268	0,6
		10	53,232	1,847	51,926	54,538	36,638	69,826	3,5
		30	45,041	0,237	44,873	45,208	42,912	47,169	0,5
	BO	2	20,165	1,353	19,208	21,122	8,005	32,325	6,7
		5	62,103	0,535	61,725	62,481	57,300	66,906	0,9
		10	33,342	0,338	33,103	33,581	30,305	36,379	1,0
		30	43,543	1,773	42,289	44,797	27,609	59,477	4,1
MAG	LP	2	32,569	0,734	32,050	33,088	25,974	39,164	2,3
		5	23,246	0,370	22,984	23,507	19,923	26,568	1,6
		10	7,048	0,017	7,036	7,060	6,896	7,200	0,2
		30	10,272	0,709	9,771	10,773	3,906	16,638	6,9
	BO	2	14,773	0,102	14,701	14,845	13,858	15,688	0,7
		5	44,765	1,044	44,026	45,503	35,381	54,148	2,3
		10	1,775	1,276	0,873	2,677	-9,686	13,236	71,9
		30	23,691	0,091	23,627	23,755	22,878	24,504	0,4

Bibliografía

- Akbik F, Cafferty WB, Strittmatter SM (2012) Myelin associated inhibitors: a link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Exp Neurol* 235:43-52.
- Alston SM, Solen KA, Broderick AH, Sukavaneshvar S, Mohammad SF (2007) New method to prepare autologous fibrin glue on demand. *Transl Res* 149:187-195.
- Andersson K, Areskoug D, Hardenborg E (1999) Exploring buffer space for molecular interactions. *J Mol Recognit* 12:310-315.
- Apodaca (2006) *Biosensores Y Biochips: Herramientas Para El Diagnóstico Y La Terapéutica*. Madrid
- Au E, Roskams AJ (2003) Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia* 41:224-236.
- Au E, Richter MW, Vincent AJ, Tetzlaff W, Aebbersold R, Sage EH, Roskams AJ (2007) SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci* 27:7208-7221.
- Barnett SC, Chang L (2004) Olfactory ensheathing cells and CNS repair: going solo or in need of a friend? *Trends Neurosci* 27:54-60.
- Barnett SC, Riddell JS (2004) Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats. *J Anat* 204:57-67.
- Battaglia TM, Masson JF, Sierks MR, Beaudoin SP, Rogers J, Foster KN, Holloway GA, Booksh KS (2005) Quantification of cytokines involved in wound healing using surface plasmon resonance. *Anal Chem* 77:7016-7023.
- Boe R, Gjertsen BT, Vintermyr OK, Houge G, Lanotte M, Doskeland SO (1991) The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp Cell Res* 195:237-246.
- Boruch AV, Connors JJ, Pipitone M, Deadwyler G, Storer PD, Devries GH, Jones KJ (2001) Neurotrophic and migratory properties of an olfactory ensheathing cell line. *Glia* 33:225-229.

- Botero (2015) Evaluación de la regeneración axonal en ratas con sección medular aguda y crónica después del trasplante con células de la glía envolvente olfatoria y AFGF. Tesis doctoral Universidad Nacional de Colombia
- Boyd JG, Doucette R, Kawaja MD (2005) Defining the role of olfactory ensheathing cells in facilitating axon remyelination following damage to the spinal cord. *FASEB J* 19:694-703.
- Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL (1997) Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol* 148:475-494.
- Bregman BS, Coumans JV, Dai HN, Kuhn PL, Lynskey J, McAtee M, Sandhu F (2002) Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137:257-273.
- Bustos RH (2010) Development of a novel real-time method to study the erythrocytic life cycle of *Plasmodium falciparum* using Quartz Crystal Microbalance. Göttingen.
- Bustos RH, Suesca E, Millan D, Gonzalez JM, Fontanilla MR (2014) Real-time quantification of proteins secreted by artificial connective tissue made from uni- or multidirectional collagen I scaffolds and oral mucosa fibroblasts. *Anal Chem* 86:2421-2428.
- Cao L, Zhu YL, Su Z, Lv B, Huang Z, Mu L, He C (2007) Olfactory ensheathing cells promote migration of Schwann cells by secreted nerve growth factor. *Glia* 55:897-904.
- Cao L, Mu L, Qiu Y, Su Z, Zhu Y, Gao L, Yuan Y, Guo D, He C (2010) Diffusible, membrane-bound, and extracellular matrix factors from olfactory ensheathing cells have different effects on the self-renewing and differentiating properties of neural stem cells. *Brain research* 1359:56-66.
- Carreño JMGI (2011) Evaluación de la expresión de factores de crecimiento involucrados en la reparación de heridas mucosas en tejido conectivo mucoso artificial. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias.
- Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 24:5670-5683.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403:434-439.

- Cheng H, Cao Y, Olson L (1996) Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 273:510-513.
- Cheng H, Wu JP, Tzeng SF (2002) Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. *Journal of neuroscience research* 69:397-405.
- Cho N, Nguyen DH, Satkunendrarajah K, Branch DR, Fehlings MG (2012) Evaluating the role of IL-11, a novel cytokine in the IL-6 family, in a mouse model of spinal cord injury. *Journal of neuroinflammation* 9:134.
- Chou RH, Lu CY, Wei L, Fan JR, Yu YL, Shyu WC (2014) The potential therapeutic applications of olfactory ensheathing cells in regenerative medicine. *Cell Transplant* 23:567-571.
- Chou TH, Chuang CY, Wu CM (2010) Quantification of Interleukin-6 in cell culture medium using surface plasmon resonance biosensors. *Cytokine* 51:107-111.
- Chuah MI, Teague R (1999) Basic fibroblast growth factor in the primary olfactory pathway: mitogenic effect on ensheathing cells. *Neuroscience* 88:1043-1050.
- Chuah MI, West AK (2002) Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech* 58:216-227.
- Chuah MI, Tennent R, Jacobs I (1995) Response of olfactory Schwann cells to intranasal zinc sulfate irrigation. *Journal of neuroscience research* 42:470-478.
- Chuah MI HD, West AK (2011) Interaction of olfactory ensheathing cells with other cell types in vitro and after transplantation: glial scars and inflammation. *Exp Neurol* May;229(1):46-53.
- Chung RS, Woodhouse A, Fung S, Dickson TC, West AK, Vickers JC, Chuah MI (2004) Olfactory ensheathing cells promote neurite sprouting of injured axons in vitro by direct cellular contact and secretion of soluble factors. *Cell Mol Life Sci* 61:1238-1245.
- Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS (1997) Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3:73-76.
- Deckner ML, Frisen J, Verge VM, Hokfelt T, Risling M (1993) Localization of neurotrophin receptors in olfactory epithelium and bulb. *Neuroreport* 5:301-304.
- Deumens R, Koopmans GC, Joosten EA (2005) Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Progress in neurobiology* 77:57-89.

- Devon R, Doucette R (1992) Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* 589:175-179.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, Sivasankaran R, Wang K, Nikulina E, Kimura N, Cai H, Deng K, Gao Y, He Z, Filbin M (2002) Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 35:283-290.
- Doucette R (1990) Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3:433-449.
- Doucette R (1996) Immunohistochemical localization of laminin, fibronectin and collagen type IV in the nerve fiber layer of the olfactory bulb. *Int J Dev Neurosci* 14:945-959.
- Esmaili M, Berry M, Logan A, Ahmed Z (2014) Decorin treatment of spinal cord injury. *Neural Regen Res* 9:1653-1656.
- Farmer L, Sommer J, Monard D (1990) Glia-derived nexin potentiates neurite extension in hippocampal pyramidal cells in vitro. *Dev Neurosci* 12:73-80.
- Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, Wray S (2011) Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci* 31:6915-6927.
- Franceschini IA, Barnett SC (1996) Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* 173:327-343.
- Franssen EH, de Bree FM, Verhaagen J (2007) Olfactory ensheathing glia: their contribution to primary olfactory nervous system regeneration and their regenerative potential following transplantation into the injured spinal cord. *Brain Res Rev* 56:236-258.
- Freund P, Schmidlin E, Wannier T, Bloch J, Mir A, Schwab ME, Rouiller EM (2006) Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. *Nat Med* 12:790-792.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2012) *Biacore™ Assay Handbook*
- Gomez, Ghotme K, Lopez MF, F ME, Sánchez MY, Mendoza W, Dominguez A (2014) Morfometría de las células de la Glía envolvente olfatoria en un modelo animal *Neurociencias en Colombia* 21.
- Gómez (2009) Utilización de células de glía envolvente y de proteínas sintéticas en la recuperación funcional en un modelo de sección medular in vivo. Tesis Doctoral Universidad Javeriana

- Gómez DR (2013) Biosensores ópticos de alta sensibilidad basados en técnicas de modulación plasmónica. Bellaterra (Barcelona).
- Gómez R, Neira A, Tovar D, Martínez C, Bernal JE (2007) Células de glía envolvente olfatoria: potencial para la reparación de lesiones del sistema nervioso central *Universitas Médicas* 48 N° 4.
- Gomez RM, Ghotme K, Botero L, Bernal JE, Perez R, Barreto GE, Bustos RH (2015) Ultrastructural analysis of olfactory ensheathing cells derived from olfactory bulb and nerve of neonatal and juvenile rats. *Neuroscience research*.
- Goodman MN, Silver J, Jacobberger JW (1993) Establishment and neurite outgrowth properties of neonatal and adult rat olfactory bulb glial cell lines. *Brain research* 619:199-213.
- Gorrie CA, Hayward I, Cameron N, Kailainathan G, Nandapalan N, Sutharsan R, Wang J, Mackay-Sim A, Waite PM (2010) Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. *Brain Res* 1337:8-20.
- Graphpad (1998) Software Graphpad Prism.
- Graziadei GA, Graziadei PP (1979) Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8:197-213.
- Grill RJ, Blesch A, Tuszynski MH (1997) Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol* 148:444-452.
- Guthrie KM, Gall CM (1991) Differential expression of mRNAs for the NGF family of neurotrophic factors in the adult rat central olfactory system. *J Comp Neurol* 313:95-102.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Imaizumi T, Lankford KL, Kocsis JD (2000a) Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain research* 854:70-78.
- Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG, Greer CA, Kocsis JD (1998) Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord. *J Neurosci* 18:6176-6185.

- Imaizumi T, Lankford KL, Burton WV, Fodor WL, Kocsis JD (2000b) Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nature biotechnology* 18:949-953.
- J RKaV (2014) Understanding the neural repair promoting properties of olfactory ensheathing cells. *Exp Neurol*:594-609.
- Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH (2001) Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *J Physiol* 533:83-89.
- Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y, Nakamura M, Okano H (2011) The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Mol Brain* 4:34.
- Katoh-Semba R, Semba R, Takeuchi IK, Kato K (1998) Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neuroscience research* 31:227-234.
- Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S (1990) Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 91:217-223.
- Kubasak MD, Jindrich DL, Zhong H, Takeoka A, McFarland KC, Munoz-Quiles C, Roy RR, Edgerton VR, Ramon-Cueto A, Phelps PE (2008) OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131:264-276.
- Lakatos A, Barnett SC, Franklin RJ (2003) Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter. *Exp Neurol* 184:237-246.
- Lee JK, Zheng B (2012) Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury. *Exp Neurol* 235:33-42.
- Lee YS, Lin CY, Robertson RT, Yu J, Deng X, Hsiao I, Lin VW (2006) Re-growth of catecholaminergic fibers and protection of cholinergic spinal cord neurons in spinal repaired rats. *Eur J Neurosci* 23:693-702.
- Leung CT, Coulombe PA, Reed RR (2007) Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* 10:720-726.

- Li BC, Li Y, Chen LF, Chang JY, Duan ZX (2011) Olfactory ensheathing cells can reduce the tissue loss but not the cavity formation in contused spinal cord of rats. *Journal of the neurological sciences* 303:67-74.
- Li Y, Field PM, Raisman G (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277:2000-2002.
- Li Y, Yamamoto M, Raisman G, Choi D, Carlstedt T (2007) An experimental model of ventral root repair showing the beneficial effect of transplanting olfactory ensheathing cells. *Neurosurgery* 60:734-740; discussion 740-731.
- Liu C, Lei T, Ino K, Matsue T, Tao N, Li CZ (2012) Real-time monitoring biomarker expression of carcinoma cells by surface plasmon resonance biosensors. *Chem Commun (Camb)* 48:10389-10391.
- López MA, Domínguez E, Ortega F (1999) nmunoanálisis por inyección en flujo para la detección de atrazina. *Anal Real Acad Farm I*:305-325. .
- Lu M, Dong J, Lu T, Lv H, Yang P, Cheng Z, Li J, Liang B, Xu J, Li H, He X (2015) Effects of different sera conditions on olfactory ensheathing cells in vitro. *Int J Mol Sci* 16:420-438.
- Mackay-Sima A, Chuahb MI (2000) Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Prog Neurobiol* 62:527-559.
- Mandel AL, Ozdener H, Utermohlen V (2011) Brain-derived neurotrophic factor in human saliva: ELISA optimization and biological correlates. *Journal of immunoassay & immunochemistry* 32:18-30.
- Mariani S, Minunni M (2014) Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. *Anal Bioanal Chem* 406:2303-2323.
- Masgutova GA, Savchenko EA, Viktorov IV, Masgutov RF, Chelyshev YA (2010) Reaction of oligoglia to spinal cord injury in rats and transplantation of human olfactory ensheathing cells. *Bulletin of experimental biology and medicine* 149:135-139.
- Mendell LM, Munson JB, Arvanian VL (2001) Neurotrophins and synaptic plasticity in the mammalian spinal cord. *J Physiol* 533:91-97.
- Moreno-Flores MT, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (2002) Olfactory Ensheathing Glia: Drivers of Axonal Regeneration in the Central Nervous System? *Journal of biomedicine & biotechnology* 2:37-43.

- Moreno-Flores MT, Lim F, Martin-Bermejo MJ, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F (2003a) Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *J Neurochem* 85:861-871.
- Moreno-Flores MT, Lim F, Martin-Bermejo MJ, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F (2003b) High level of amyloid precursor protein expression in neurite-promoting olfactory ensheathing glia (OEG) and OEG-derived cell lines. *Journal of neuroscience research* 71:871-881.
- Moreno-Flores MT, Bradbury EJ, Martin-Bermejo MJ, Agudo M, Lim F, Pastrana E, Avila J, Diaz-Nido J, McMahon SB, Wandosell F (2006) A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Mol Ther* 13:598-608.
- Muñetón, Julián S, Taylorz, Manuel Nieto-Sampedro (2001) Mecanismos involucrados en la promoción de crecimiento axonal por la glía envolvente del bulbo olfatorio. *Biomédica* 1;21:172-181.
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ (2001) New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia* 34:81-87.
- Nielsen J, Gotfryd K, Li S, Kulahin N, Soroka V, Rasmussen KK, Bock E, Berezin V (2009) Role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-neural cell adhesion molecule (NCAM) interactions in induction of neurite outgrowth and identification of a binding site for NCAM in the heel region of GDNF. *J Neurosci* 29:11360-11376.
- Nyatia E, Lang DM (2007) Localisation and expression of a myelin associated neurite inhibitor, Nogo-A and its receptor Nogo-receptor by mammalian CNS cells. *Research in veterinary science* 83:287-301.
- Pellitteri R, Spatuzza M, Russo A, Zaccheo D, Stanzani S (2009) Olfactory ensheathing cells represent an optimal substrate for hippocampal neurons: an *in vitro* study. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 27:453-458.
- Pérez Escoda MT (2007) Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). Universidad de Barcelona.
- Pineau I, Sun L, Bastien D, Lacroix S (2010) Astrocytes initiate inflammation in the injured mouse spinal cord by promoting the entry of neutrophils and inflammatory monocytes in an IL-1 receptor/MyD88-dependent fashion. *Brain Behav Immun* 24:540-553.

- Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, Gallo V, Kocsis JD (2011) CNPase expression in olfactory ensheathing cells. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:608496.
- Radtke C, Akiyama Y, Brokaw J, Lankford KL, Wewetzer K, Fodor WL, Kocsis JD (2004) Remyelination of the nonhuman primate spinal cord by transplantation of H-transferase transgenic adult pig olfactory ensheathing cells. *Faseb J* 18:335-337.
- Ramon-Cueto A (2011) Olfactory ensheathing glia for nervous system repair. *Exp Neurol* 229:1.
- Ramon-Cueto A, Avila J (1998) Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* 46:175-187.
- Ramon-Cueto A, Perez J, Nieto-Sampedro M (1993) In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 5:1172-1180.
- Ramon-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB (1998) Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18:3803-3815.
- Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, Avila J (2000) Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25:425-435.
- Ramos-Quiroga JA, Sanchez-Mora C, Corominas M, Martinez I, Barrau V, Prats L, Casas M, Ribases M (2014) [Neurotrophic factors and their importance in attention deficit hyperactivity disorder]. *Rev Neurol* 58 Suppl 1:S19-24.
- Richter MW, Fletcher PA, Liu J, Tetzlaff W, Roskams AJ (2005) Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci* 25:10700-10711.
- Ritzefeld M, Sewald N (2012) Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. *J Amino Acids* 2012:816032.
- Roet KC, Verhaagen J (2014) Understanding the neural repair-promoting properties of olfactory ensheathing cells. *Exp Neurol* 261:594-609.
- Roskams AJ, Bethel MA, Hurt KJ, Ronnett GV (1996) Sequential expression of Trks A, B, and C in the regenerating olfactory neuroepithelium. *J Neurosci* 16:1294-1307.
- Sandvig I, Thuen M, Hoang L, Olsen O, Sardella TC, Brekken C, Tvedt KE, Barnett SC, Haraldseth O, Berry M, Sandvig A (2012) In vivo MRI of olfactory ensheathing cell

- grafts and regenerating axons in transplant mediated repair of the adult rat optic nerve. *NMR in biomedicine* 25:620-631.
- Santos-Silva A, Fairless R, Frame MC, Montague P, Smith GM, Toft A, Riddell JS, Barnett SC (2007) FGF/heparin differentially regulates Schwann cell and olfactory ensheathing cell interactions with astrocytes: a role in astrocytosis. *J Neurosci* 27:7154-7167.
- Sasaki M, Lankford KL, Zemedkun M, Kocsis JD (2004) Identified olfactory ensheathing cells transplanted into the transected dorsal funiculus bridge the lesion and form myelin. *J Neurosci* 24:8485-8493.
- Sasaki M, Li B, Lankford KL, Radtke C, Kocsis JD (2007) Remyelination of the injured spinal cord. *Prog Brain Res* 161:419-433.
- Sasaki M, Lankford KL, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD (2011) Remyelination after olfactory ensheathing cell transplantation into diverse demyelinating environments. *Exp Neurol* 229:88-98.
- Sasaki S, Kai E, Miyachi H, Muguruma H, Kebukuro K, Ohka W A H, Karube I (1998) Direct determination of etofenprox using surface plasmon resonance. *Anal Chim Acta* 229-233.
- Schwab ME (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science* 295:1029-1031.
- Schwab ME (2004) Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:118-124.
- Serrano-Sanchez T, Diaz-Armesto I (1998) [Brain-derived growth factor: current aspects]. *Rev Neurol* 26:1027-1032.
- Smale KA, Doucette R, Kawaja MD (1996) Implantation of olfactory ensheathing cells in the adult rat brain following fimbria-fornix transection. *Exp Neurol* 137:225-233.
- Su Z, Cao L, Zhu Y, Liu X, Huang Z, Huang A, He C (2007) Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *Journal of cell science* 120:1877-1887.
- Su Z CL, Zhu Y, Liu X, Huang Z, Huang A (2007) Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *J Cell Sci Jun* 1 1877-1887.
- Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 16:121-131.
- Thillaivinayagalingam P, Newcombe AR, O'Donovan K, Francis R, Keshavarz-Moore E (2007) Detection and quantification of affinity ligand leaching and specific antibody fragment concentration within chromatographic fractions using surface plasmon resonance. *Biotechnol Appl Biochem* 48:179-188.

- Tsai MC, Shen LF, Kuo HS, Cheng H, Chak KF (2008) Involvement of acidic fibroblast growth factor in spinal cord injury repair processes revealed by a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 7:1668-1687.
- Turner CP, Perez-Polo JR (1992) Regulation of the low affinity receptor for nerve growth factor, p75NGFR, in the olfactory system of neonatal and adult rat. *Int J Dev Neurosci* 10:343-359.
- Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO, Jr. (1991) Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain research* 542:280-285.
- Wu XF, Xu YX, Shen GX, Kamei K, Takano R, Hara S (2003) Surface plasmon resonance analysis to evaluate the importance of heparin sulfate groups' binding with human aFGF and bFGF. *J Zhejiang Univ Sci* 4:86-94.
- Yan H, Bunge MB, Wood PM, Plant GW (2001) Mitogenic response of adult rat olfactory ensheathing glia to four growth factors. *Glia* 33:334-342.
- Ziamba KS, Chaudhry N, Rabchevsky AG, Jin Y, Smith GM (2008) Targeting axon growth from neuronal transplants along preformed guidance pathways in the adult CNS. *J Neurosci* 28:340-348.
- Zurita M, Vaquero J (2006) Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosci Lett* 402:51-56.