



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



CULTIVO DE CÉLULAS DE SCHWANN Y EFECTO DE LA NEURREGULINA SOBRE EL MISMO

*TRABAJO FIN DE MASTER: Investigación en
Ciencias de la Salud.*

María Isabel Pedraza Hueso

Tutor: Manuel Garrosa García

<u>ÍNDICE</u>	<u>pág.</u>
1. INTRODUCCIÓN	2-12
1.1. Las células de Schwann	2-4
1.1.1. Origen embrionario de las Células de Schwann.	
1.1.2. Morfología de las CS	
1.1.3. Función de las CS.	
1.1.4. Composición de la mielina.	
1.2. Regeneración axonal	5
1.2.1. Degeneración-regeneración axonal.	
1.3. Cultivo de CS – aplicación clínica	6-12
1.3.1. Cultivo celular. Repaso histórico.	
1.3.2. Factores de crecimiento celular. Función in vivo e in vitro.	
1.3.3. Cultivo de CS.	
- Repaso histórico.	
- Características y limitaciones de los cultivos de CS.	
- Empleo de FC en el cultivo de CS.	
1.3.4. Aplicación clínica del cultivo de CS	
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS	13-17
3.1. Material	13-14
3.2. Métodos	15-17
4. RESULTADOS	17-28
4.1. Estudio morfológico de los cultivos.	17-24
4.2. Estudio cuantitativo de los cultivos.	25-28
5. DISCUSIÓN	29-30
6. CONCLUSIONES	31
7. BIBLIOGRAFÍA	32-35

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÉLULA DE SCHWANN

Las células de Schwann (CS) forman parte del tejido glial del sistema nervioso periférico (SNP). Forman parte tanto de las fibras mielínicas que presentan un mayor calibre como de las fibras amielínicas de menor diámetro.

1.1.1. Origen embrionario de las CS

Las CS tienen un origen ectodérmico originándose en la cresta neural formada a partir de la placa neural. En dicha placa inicialmente tiene lugar una invaginación del ectodermo dorsal dando lugar a la hendidura o surco neural y a unos pliegues neurales alrededor de ella. En la parte más interna de los pliegues se localizan las células que darán lugar a la cresta neural. Los pliegues del surco se cierran dando lugar al tubo neural (1). El proceso de desarrollo está regulado por diferentes factores ambientales. Así en primer lugar, a partir de la cresta neural se desarrollarán los precursores de las CS, posteriormente las CS inmaduras y finalmente se producirá la diferenciación de las mismas en mielínicas y amielínicas que envolverán los axones del SNP (2, 3,4)

1.1.2. Morfología de las CS

La CS adulta es una célula aplanada que presenta un núcleo oval alargado y heterocromático con un citoplasma pequeño en el que se puede visualizar el aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias a su alrededor, así como lisosomas. Sus filamentos intermedios están formados por una proteína fibrosa llamada vimentina y en la periferia hay vesículas desnudas y rodeadas de claritina cuya función es aislar a la célula del tejido endoneural y cubre áreas superpuestas de las láminas de la vaina de mielina. La membrana posee canales iónicos dependientes de voltaje y de ligando que secretan neuregulina y citocinas. Estas sustancias actúan sobre el diámetro del axón y en diferentes procesos como son la fosforilación oxidativa de los neurofilamentos axónicos, en el transporte axonal, en la expresión de proteínas y en la apoptosis de las propias CS (5,6).

Las CS mielínicas se organizan en una fina capa entorno a la mielina que rodea al axón dando lugar a lo que se conoce como vaina de Schwann. Clásicamente se consideraba que la mielina y la CS eran dos estructuras diferentes, pero en la actualidad al visualizarlas a través del microscopio electrónico se ha podido comprobar que la

mielina forma parte de la membrana superficial de la célula encontrándose enrollada en forma de espiral. La vaina de mielina y la vaina de Schwann están interrumpidas, presentando unos intervalos regulares que son los nódulos de Ranvier. En estos puntos el axón se encuentra prácticamente descubierto, únicamente se encuentra envuelto por expansiones procedentes de las CS. Entre dos nódulos se encuentra una CS con su correspondiente mielina. (7)

Entre las láminas de mielina enrolladas entorno al axón se forman unos espacios con pequeña cantidad de citoplasma y mielina denominados:

- Collarete interno de citoplasma de la CS cuando se encuentra entre el axón y la mielina.
- Hendidura de Schmidt-Lantermann ubicados entre laminillas sucesivas de mielina con forma de cono a cada lado del segmento internodal. En este citoplasma se pueden observar mitocondrias, lisosomas, microtúbulos y cuerpos densos. El número de hendiduras es directamente proporcional al grosor del axón (8).

Las neuronas amielínicas se encuentran en unas invaginaciones o surcos, encontrándose también envueltas por CS, alargadas y colocadas paralelamente al axón. No contienen mielina ni nódulos de Ranvier (8). Entre la membrana del axón y la CS se forma una hendidura denominada mesaxón (6).

1.1.3. Funciones de las CS

CS son necesarias para una óptima función del SNP, proporcionan un soporte estructural y trófico siendo ambos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las neuronas y de la funcionalidad de dicho sistema, así en los axones mielínicos llevan a cabo una aceleración del impulso nervioso (2). La función principal de las CS es la envoltura de los axones de los nervios periféricos y ante una lesión juegan un papel fundamental creando un microambiente adecuado para la regeneración de los mismos, interviniendo en la formación de mielina y segregando componentes que forman parte de la lámina basal, integrinas y lamininas, etc., que actúan estimulando el crecimiento axonal y neutralizando las influencias inhibitorias. Además segregan factores neuroprotectores, tróficos y neurotróficos, los más importantes son los pertenecientes a la familia de las neurotrofinas. En este grupo se encuentra el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento glial (GGF), el factor de crecimiento de

fibroblastos (FGF), la interleucina 6 y la neurotrofina 3-4/5 (NT 3-4/5). Ejercen su función sobre la actividad neuronal, durante la vida embrionaria inducen el desarrollo y la maduración, mientras que en el adulto promueven el mantenimiento de la actividad, así como la regeneración del nervio tras una lesión, favoreciendo la proliferación, crecimiento y supervivencia del mismo (9,10,11,12) :

- NGF: se encuentra en bajas concentraciones en el nervio normal. En el proceso de degeneración walleriana aumenta su síntesis tanto en el cuerpo como en el soma de las neuronas motoras y en las CS (13).
- BDNF: ejerce su función en el proceso de regeneración, mediado por la tirosina kinasa. Sus niveles aumentan ante una lesión axonal y es necesario tanto para la regeneración como para la mielinización (14).
- CNTF: se expresa no sólo en las CS del SNP sino que también lo hace en el sistema nervioso central (SNC) y en el músculo esquelético (15).
- GDNF: está disminuido en las CS denervadas crónicamente. Actúa en la supervivencia de la neurona (16).
- NT: actúan en la supervivencia y en la regeneración neuronal (17).
- Las neuregulinas son necesarias en el axón ya que son las responsables de la proliferación de las CS durante la regeneración y la mielinización del mismo. Ejercen su función a través de la interacción con los receptores ErbB. También se encuentran en las uniones neuromusculares donde ayudan a la diferenciación de las fibras musculares y en el SNC donde influyen en el desarrollo de astrocitos y oligodendrocitos (18).

El axón y la CS desarrollan sus funciones de una forma recíproca mediante la liberación de diferentes marcadores. Así el axón determinará que una CS se diferencie como mielínica o amielínica. Otra de las funciones esenciales de las CS es intervenir en la regeneración nerviosa tras una lesión.

1.1.4. Composición de la mielina

La mielina está formada principalmente por (6):

- Lípidos complejos (75%)
- Proteínas (20-25%): proteína básica de la mielina, proteína mielínica periférica 22, proteína 0, proteínas de enlace (conexina), cadherina F y la glucoproteína asociada a la mielina.

1.2. REGENERACIÓN AXONAL

1.2.1. Degeneración-regeneración axonal

Existen diferentes tipos de lesión axonal, cuanto mayor sea la distancia entre el soma y la lesión, existirá menor capacidad de regeneración.

Así tras una lesión nerviosa, por ejemplo tras una sección del nervio, en el extremo proximal tiene lugar lo que se conoce como degeneración retrógrada mientras que en el distal ocurre un fenómeno denominado Degeneración Walleriana, las células que fundamentalmente se encargan de dicho proceso son las CS. Presentan una serie de cambios reactivos tanto a nivel molecular como celular.

- Degeneración retrógrada: entre las 12 y las 24 horas después de la lesión se produce una dilatación y edema del axón, formando unas estructuras en forma de bulbo que contienen gran cantidad de filamentos y de organelas. En el citoplasma se desorganizan los gránulos de Nissl, a este proceso se le denomina cromatólisis y tienen lugar la migración del núcleo hacia la periferia de la célula (19).
- Degeneración Walleriana: las CS están encargadas de eliminar junto a los macrófagos los detritus mielínicos y celulares. Además sufren una dediferenciación, transformándose en CS amielínicas por activación del receptor erbB2/3 y proliferando, dando lugar a las bandas de Büngner que proporcionan una guía para el crecimiento del extremo lesionado. Finalmente se rediferencian y, en su caso mielinizan el axón regenerado produciendo la secreción de los diferentes factores mencionados anteriormente que ayudan a reparar el daño del nervio. Además se secretan tanto por CS como por macrófagos citoquinas, el factor alfa de necrosis tumoral y la interleukina alfa (3,9,20,21).

La proliferación de las CS ocurre durante unas 3 semanas, pudiendo aumentar hasta en 10 veces la población inicial. Se ordenan en forma lineal sobre la lámina basal y los axones regenerados se invaginan en el interior de los tubos formados por las CS volviéndose a mielinizar. El crecimiento de los brotes del axón en proceso de regeneración presenta una velocidad de crecimiento de unos 3-4 milímetros por día (19).

1.3. CULTIVO DE CS. APLICACIÓN CLÍNICA

1.3.1. Cultivo celular. Repaso histórico.

Entre 1880 y 1910 tienen lugar los primeros ensayos de supervivencia de las células fuera de organismos enteros llevados a cabo por Roux, Haberlandt, etc. (22)

El primer cultivo celular fue llevado a cabo por Ross Harrison en 1907, quien demostró las condiciones necesarias para el mantenimiento de los nervios procedentes de embriones de rana y observó la elongación de sus fibras nerviosas (23).

Posteriormente Carrel en 1912, demostró empleando embriones de pollo que las condiciones de asepsia eran necesarias para mantener la vida de los cultivos celulares (24).

El empleo de antibiótico en los años 40 aumentó la supervivencia celular en los cultivos, en la década de los 50 se empezaron a usar medios definidos, por ejemplo los de Morgan en 1950 y Eagle en 1955. En la década posterior se emplearon medios libres de suero, para en los años 70 utilizar medios libres de suero de hormonas y factores de crecimiento (25).

La aparición de la tecnología del DNA recombinante permitió que Kholer y Milstein en 1975 crearan hibridomas celulares que eran capaces de producir un anticuerpo determinado que fue utilizado para el diagnóstico, tratamiento y sobre todo en el ámbito de la investigación (26).

En 1998 fueron publicados los primeros estudios sobre células madre, en los que se describía su carácter pluripotencial para dar lugar a células procedentes de diferentes capas embrionarias. Estas células fueron obtenidas *in vitro* a partir de blastocistos humanos y expresaban marcadores de superficie específicos (27).

*1.3.2. Factores de crecimiento celular. Funciones *in vivo* e *in vitro**

Los factores de crecimiento (FC) se unen a unos receptores glicoprotéicos de membrana y tiene lugar el inicio de la transducción de la señal. Se encargan de regular procesos como la inducción embrionaria, la diferenciación, la muerte y la motilidad celular (28).

Actualmente estudios investigan nuevas aplicaciones de los FC en los cultivos celulares y con ello su empleo en el tratamiento de diversas patologías (29).

Familia del factor de crecimiento epidérmico (30).

Dentro de este grupo se encuentran EGF, TGF α , Int 2, *Vaccinia growth factor*, anfirregulina, beta regulina y la subfamilia de las neurregulinas.

EGF y TGF α presentan una homología del 55% con unas acciones biológicas similares debido a que se unen al mismo receptor. La expresión del gen del receptor para EGF es abundante en epitelios y varía en función del sexo, la edad y la hora del día. EGF lleva a cabo su actuación por mecanismos paracrinos mientras que TGF los realiza por mecanismos autocrinos. El receptor de ambos es c-ErbB o EGFR una tirosina kinasa transmembrana.

In vitro, EGF y TGF estimulan la proliferación de poblaciones epiteliales como son hepatocitos y células de los túbulos renales.

In vivo, la administración de EGF a ratones aumentó la proliferación de epitelio de las criptas intestinales, esófago, hígado, páncreas y riñón. Mientras que la administración de TGF produjo un aumento de la proliferación de hepatocitos y queratinocitos.

Durante el desarrollo embrionario son factores fundamentales en las etapas iniciales del mismo. EGF materno es necesario para el desarrollo del saco vitelino y para la neurogénesis temprana, mientras que el TGF lo es para el desarrollo del metanefros.

Las neurrgulinas forman parte de la familia del EGF, ejercen su función a través de un receptor Her-2/Neu y su función principal es intervenir en el desarrollo del sistema nervioso y del cardíaco.

Familia de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (31)

Actúan como mediadores de las acciones de la hormona del crecimiento. En este grupo se incluyen las IGFs (I y II). Presentan dos receptores IGFR I y uno IGFR II, éste último sin actividad tirosina kinasa.

In vitro, IGFs presentan efectos mitogénicos, necesitando de otros factores. En los cultivos celulares, incrementan la proliferación de condrocitos, osteoblastos, miocitos lisos, células del epitelio del túbulo contorneado proximal, queratinocitos y astrocitos. Impiden la apoptosis de células hematopoyéticas. Estimulan la diferenciación de los mioblastos y de los osteoblastos.

In vivo, son mediadas muchas acciones de la hormona de crecimiento.

Familia del Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (32)

Esta familia incluye 5 tipos PDGF (AA, BB, AB, C y D) y el factor de crecimiento para stem cells (SCF). Además este grupo se relaciona estructuralmente con la familia VEGF. Los receptores PDGFR son tirosina kinasas.

In vitro, PDGF estimula la proliferación y detiene la diferenciación de miocitos del músculo liso y células de Ito.

In vivo, interviene en procesos de regeneración y reparación, por ejemplo muscular y cutánea. En el sistema nervioso, actúa de forma paracrina sobre la supervivencia y proliferación de células de la glía.

Factor de crecimiento para mastocitos o factor de crecimiento para stem cells (SCF)(33)

Es necesario para el mantenimiento de células primordiales germinativas in vitro y de los melanocitos in vivo. Tiene un receptor tirosina kinasa.

Familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (34).

Comprende al menos 23 factores diferentes, siendo el prototipo FGF-2. Actúan mediante receptores tirosina kinasa y actuando directamente sobre el núcleo. Aumentan en algunos tumores, donde actúan como factores de transcripción.

In vitro, poseen efectos mitogénicos y quimiotácticos y actúan sobre la diferenciación celular de condrocitos, hepatocitos, osteoblastos, mioblastos, melanocitos, células indiferenciadas del sistema nerviosos, etc.

In vivo, FGF estimula la proliferación queratinocítica, reducen el área de isquemia después de un infarto de miocardio e inducen neovascularización en las úlceras gastroduodenales.

Superfamilia del factor de crecimiento transformante Beta (35).

Estas sustancias inhiben la proliferación y promueven la transformación de fibroblastos y la diferenciación de los condrocitos. Presentan tres tipos de receptores, el tipo I son quinasas de serina y treonina, que inician la cascada de reacciones de la célula.

- *Familia de los TGF*: Son los inhibidores de proliferación celular más importantes.

In vivo, actúan sobre epitelios (epidermis, enterocitos y hepatocitos), endotelios y fibroblastos. Estimulan la diferenciación y la síntesis de colágeno, fibronectinas y proteoglicanos en los cultivos celulares.

- *Familia de las inhibinas y activinas que* inhiben y estimulan la síntesis de FSH correspondientemente. Las activinas presentan una función neuroprotectora en las lesiones del sistema nervioso.

- *Familia DPP:* sus funciones incluyen la participación en la supervivencia y proliferación celular, morfogénesis, diferenciación y apoptosis. Dentro de este grupo se encuentran los BMP inducen respuestas de quimiotaxis, proliferación y diferenciación. Dentro de esta familia se encuentran GDNF, Mis y nodal.

Factor de crecimiento de hepatocitos (36)

Regula la proliferación, morfogénesis y desplazamiento epitelial. Es sintetizado en el hígado y en el riñón. Presenta un receptor tirosina kinasa.

In vitro, es el mitógeno más potente para los hepatocitos y de las células de los túbulos renales. Además estimula las líneas celulares de melanomas y carcinomas mamarios. Pueden actuar sobre la motilidad celular en los cultivos primarios.

Familia del VEGF (37)

Dentro de este grupo se encuentra PlGF, VEGF-B, VEGFC, VEGF-D y E. Actúan bajo un mecanismo paracrino y son los factores angiogénicos más potentes conocidos.

Factor de crecimiento endotelial derivado de glándulas endocrinas (38)

Se encuentra en glándulas endocrinas como ovario, testículo, corteza adrenal y placenta. Su administración produce proliferación, migración y formación de células endoteliales de las glándulas.

Angiopoyetinas y Efrinas (39)

Las primeras intervienen en el desarrollo del árbol vascular y cardíaco y presentan un receptor tirosina kinasa. Las segundas además de participar en la angiogénesis actúan como inductoras en el desarrollo embrionario.

1.3.3. Cultivo de CS.

- Recuerdo histórico

A lo largo de la historia se ha intentado encontrar solución para las distintas limitaciones que nos encontramos a la hora del cultivo in vitro de CS. Así podemos encontrar cómo los primeros en estudiar las características del crecimiento de las CS obtenidas a partir de nervio periférico humano extraído a las 12 semanas de gestación fueron Murray y Stout en 1942 (40).

Posteriormente se llevaron a cabo estudios en animales de experimentación adultos ya que las células adultas se comportan de forma diferente que las embrionarias. Así Anselin et al, en 1998 observaron cómo la CS tenía capacidad de crecer sobre la placa de cultivo, pero esta capacidad de proliferación era difícil de mantener pasadas las primeras 24 horas (41).

Se intentaron perfeccionar y mejorar los materiales para obtener una mayor proliferación además de una mejor calidad de las CS. Para ello se compararon diferentes cultivos, se añadieron distintas sustancias, por ejemplo, mielina objetivándose una reducción de hasta el 75% del estado proliferante, factores de crecimiento para melanocitos, fosfocolina, factor de crecimiento fibroblástico, extractos de pituitaria consiguiéndose una pureza en los cultivos del 90% y aumentando la proliferación en un 40% como fue descrito por Mauritz et al en 2004 (42).

Así mismo se intentó encontrar factores para eliminar el sobrecrecimiento de fibroblastos, por ejemplo, empleando anticuerpos contra las proteínas de los fibroblastos, otros como Kreider et al. en 1982, han intentaron aumentar la pureza de los cultivos aprovechando la capacidad que presentan los fibroblastos para adherirse a las superficies tras ser sometidos a un tratamiento con enzimas y calentamiento. Mediante este proceso se rescataban las células no adheridas y se obtenía una pureza en el cultivo de hasta el 90% (43).

Otro de los mecanismos con los que se intentó aumentar la proliferación y la pureza de los cultivos fue la pre-degeneración in vivo e in vitro. Se realizaron diferentes estudios para evaluar cuál era el mejor medio para llevarla a cabo y cuál era la duración óptima del proceso, así los mejores resultados fueron publicados por Hanemann et al en 1998 (44) y por Manent et al en 2003 (45). El primero de ellos demostró que el mejor medio para la incubación era DMEM junto con SBF al 10% y antibiótico obteniéndose los mejores resultados a los 14 días, mientras que el segundo los obtuvo con el mismo medio a los 7 días.

- Características y limitaciones de los cultivos de CS.

La CS es una de las células mejor estudiadas debido no solamente a la función regeneradora del nervio dañado sino a la capacidad de crear un microambiente adecuado para que se lleve a cabo.

La mayoría de estos estudios se están realizando con CS procedente de animales de experimentación, frecuentemente a partir de su nervio Ciático, con la dificultad de trasladarlos a CS humanas ya que presentan importantes limitaciones como son la dificultad para su obtención así como el mantenimiento de los cultivos (9). Las CS presentan positividad para dos marcadores moleculares, S100 y p75, que permite su diferenciación (40).

El cultivo de CS presenta bajo rendimiento con escasa proliferación celular (21), y con sobrecrecimiento de fibroblastos que dificultan la obtención de cultivos puros. Se intentan llevar a cabo una eliminación de los mismos mediante diferentes técnicas como son el uso de antimetabólicos, la adhesión diferencial, la clasificación magnética o el inmunopanning (3, 10, 20). Esta baja capacidad de proliferación podría ser debida a que muchas CS no podrían salir del ciclo celular y por tanto continuar la proliferación.

Diferentes estudios han mostrado que la pre-degeneración del nervio in vivo o in vitro, con la que se pretende inducir la degeneración walleriana, es el método más efectivo para conseguir una mayor proliferación de la CS y pureza del cultivo, ya que estimula a dichas células y se produce una mayor liberación de factores de crecimiento. (3,20).

Otra importante limitación de la utilización del cultivo de CS es la supervivencia celular una vez realizado el trasplante celular. Existe una importante muerte celular probablemente ocasionada por una serie de fenómenos: inflamatorios, isquémicos y por un déficit de soporte celular (46).

- Empleo de factores de crecimiento en los cultivos de CS:

El crecimiento de las CS en los cultivos se encuentra favorecido cuando se encuentran bajo el estímulo de diferentes factores de crecimiento como son el PDGF, aFGF, FGF, y el TGF beta 1-2 (28).

Además el empleo de otros factores de crecimiento como son NGF, BDNF, Neurotrofina-3, CNTF y GDNF estimulan la diferenciación de las mismas en los cultivos (28).

1.3.4. Aplicación clínica del cultivo de CS.

Actualmente se están realizando múltiples estudios para evaluar el potencial de las CS en el trasplante celular y su utilidad regeneradora tanto en patologías del SNP como del SNC (10,16, 46, 47, 48, 49):

- Lesiones traumáticas
- Enfermedades desmielinizantes de distintas etiologías, por ejemplo:
 - Hereditaria, como por ejemplo la neuropatía sensitivo-motora denominada Charcot- Marie-Tooth, que puede presentar una herencia autosómica dominante, recesiva o ligada al cromosoma X.
 - Inmunológico como la esclerosis múltiple, donde la desmielinización ocurre a nivel del SNC.
 - Inflamatoria-autoinmune, representadas por el Síndrome de Guillain-Barré.
 - Metabólicas, por ejemplo la mielinolisis central pontina y extrapontina.
 - Infecciosas como por ejemplo la leucoencefalopatía multifocal progresiva producida por el virus JC, en condiciones de inmunodepresión.
- Enfermedades de motoneurona como la Esclerosis lateral amiotrofica en la que hay una afectación de motoneurona superior y/o inferior.

2. OBJETIVOS

1. Obtener cultivos de CS de rata realizando una pre-degeneración “in vitro”.
2. Cuantificar dicho cultivo a lo largo de su crecimiento.
3. Comparar el rendimiento del cultivo de dichas células expuestas a neuregulina (NRG) con el de cultivos sin este factor.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Rata Wistar adulta, hembra, de 240 gramos de peso y con una edad de 3 meses y 16 días. Las CS se obtuvieron a partir de ambos Nervios Ciáticos.

El cuidado y la manipulación se llevó a cabo según está reflejado en las directrices de la Unión Europea 2010/63/EU y del Estado Español (RD 1201/2005).

Material empleado para la extracción del Nervio fue el siguiente:

- Anésticos: Ketamina 0.13 ml/100 mg (Ketalar 50 mg/ml, Pfizer ref. 631028) Xilacina 0.02 ml/100 mg (Rompun 2%, Bayer Health Care ref. 011302103) que fueron administrados mediante una inyección intraperitoneal.
- Material quirúrgico estéril.
- Microscopio Optomic.

Material utilizado para el procesamiento, digestión, obtención y mantenimiento del tejido nervioso:

- Reactivos: Medios de cultivo: Leivobitz, L15, (ref- 5520, Sigma Aldrich), Dulbecco's Modified Eagle Medium (ref 6046, Sigma Aldrich), Colagenasa tipo II extraída de Clostridium Histolyticum y liofilizada (ref. 17101-015Gibco), Tripsina (1800 Unit/mg, Sigma ref. T- 7409), Antibiótico-antimicótico: 10000 unit/ml de penicilina G sódica, 10000 Ug/ml de sulfato de estreptomina y 25 Ug/ml de anfotericina B (Gibco), Suero Bobino Fetal (ref. 9665 Sigma-Aldrich), Neuregulin/rh NRG-1 B1/HR-B1/Heuregulin 10 nm (8UI ml/medio). (R y D systems), Cloruro de Amonio, solución de Azul Tripan.
- Material de laboratorio: placas de cultivo (Falcon ref. 353001, diámetro 35x10 mm). Frasco de polipropileno (Falcon ref. 352006, 17x 100 mm). Tubo (Falcon ref 352005), Copa de disociación de 85 mil con malla.
- Equipos de laboratorio de cultivo: Centrífuga 5702, Eppendorf, Hucoa- Erloss, Baño María (Trade Raipa), Campana de flujo laminar de seguridad biológica (Herra Safe Heraeus), Estufa (HeraSafe Heraeus)

Material empleado para el lavado y fijación de las células:

- Paraformaldehído tamponado 4% (PFT). Se añaden 40 gramos de paraformaldehído en polvo (pancreat ref. 141451) y 0.01 gramos de NaOH (pacreat ef 131687) a 400 mililitros de agua destilada. Luego se calienta y se agita hasta que se diluya completamente y la solución se ponga transparente, a unos 60°C. Posteriormente se deja enfriar o se enfría en hielo.
Se añaden 250 ml del tampón fosfato 0,4 M y se completa hasta un litro de agua destilada
- Solución de Hank: Se prepara de la siguiente forma:
Se disuelven en agua destilada, con agitación los siguiente reactivos:
KCl (0.4 g^l⁻¹), NaCl (0.8 g^l⁻¹), KH₂PO₂ (0.6 g^l⁻¹), NH₂ HPO₄ (0.048 g^l⁻¹), Na HCO₃ (Merck ref. 6329, 0.35 g^l⁻¹), EDTA (Ácido etilendiaminotetracético Pancreac, ref 131026, 0.2 g^l⁻¹)
Se ajusta el pH con HCl o NaOH 1N hasta el intervalo 7.0-7.2
Se filtra (filtro de 0.2 Um) para obtener un producto “esteril”.
- Solución Tripsina-Hank:
Se disuelven con agitación 0.5 g^l⁻¹ de tripsina en una solución de Hank. Se filtra (filtro de 0.2 Um) para obtener un producto “esteril”.
- Solución Azul Tripan (Merk ref. 11732). Se disuelve azul tripan en una disolución de sal de Hank a razón de 0.5 g^l⁻¹
- Solución de Giemsa (10 a 20%)

Material empleado para observación y contaje de células, obtención de fotografías:

- Cámara de Neubauer
- Microscopio invertido (Zeiss Axiovert 25)
- Microscopio de contraste de fase (Microscopio Nikon Eclipse TE 300 con cámara fotográfica digital Nikon DXM 1200)
- Cámara fotográfica digital Nikon DXM 1200

3.2 MÉTODOS

Obtención de CS. Extracción del Nervio Ciático:

Una rata Wistar fue estudiada y empleada para la obtención y multiplicación en cultivo de las CS a partir del Cultivo de las CS procedentes del Nervio Ciático.

Tras 13 días se obtuvieron 2 grupos de placas, cada uno formado por 4 placas de cultivo (4 con NRG y 4 sin NRG), se fijaron y se contaron entre las 48 y 96 horas, dos placas con NRG y dos sin NRG fueron teñidas con Giemsa y 2 con NRG y 2 sin NRG fueron desprendidas y congeladas para futuros estudios.

La rata fue anestesiada mediante una inyección intraperitoneal (1.5 mililitros por kilogramo de peso) de Ketamina 80% y Xilacina 20%. Se realizó una incisión de unos dos centímetros en la piel del muslo. Tras la retracción de músculo glúteo, el nervio ciático quedó expuesto y se cortó proximalmente a la altura del tercio superior del muslo y distalmente en la zona próxima a la bifurcación tibia-peroné. El nervio seccionado se colocó en una placa de cultivos de 3.5 centímetros (Falcón, ref. 353001) que contiene una solución de Leibovitz con antibiótico-antimicótico. En esta placa se limpió el material, retirando el epineuro, restos de sangre y otros tejidos, luego se pasó a otra placa y se troceó en porciones de 2 a 5 milímetros de longitud. La cirugía y la limpieza se hicieron con un Microscopio Optomic C12.

Predegeneración y cultivo de CS.

Las porciones de nervio obtenidas se pasaron a un medio Dulbecco modificado con 10% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico y neurregulina, 10 nM (8uL/ml), se llevaron a una estufa a 37°, con 5% de CO₂ y saturación de humedad y se dejaron en predegeneración en este medio durante 7 días. El séptimo día se retiraron del medio y se introdujeron en un tubo (Falcón ref. 352005), en una solución que contiene 2 mililitros de Leibovitz, antibiótico-antimicótico, 0.5% de tripsina y 0.125% de colagenasa tipo II. En esta solución se dejaron de tres a cuatro horas en un baño a 37°C agitándolo manualmente cada 15 minutos. Después de este tiempo se agregaron 2 mililitros de DMEM (Gibco ref. 31885-023) con 10% SBF y antibiótico-antimicótico y se centrifugó, a 2000rpm, durante tres minutos, retirándose el medio a continuación. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 mililitro de una solución del mismo medio. Esta solución se sembró en dos placas, una de las cuales contiene 2.5 mililitros del mismo medio con neurregulina, 10nM (8ul/ml), a la otra placa no se le añadió neurregulina.

Las placas se mantienen en una estufa a 37°C, con 5% de CO₂ y saturación de humedad. Cuando llegan a la subconfluencia se resiembran en cuatro placas con neurregulina y cuatro sin neurregulina.

Subcultivo de CS

Cuando las CS se aproximan a la confluencia, ocupando al menos un 80% de la superficie de cultivo, se subcultivaron. Para ello, se eliminó de cada placa el medio de cultivo y se lavaron las células con solución de Hank, luego se adicionó una solución de Tripsina-Hank a los cultivos donde había CS, la tripsina se retiró inmediatamente y se esperó un minuto para que las células se desprendieran. A continuación, se añadió DMEM más antibiótico y SBF a cada placa de donde se extrajeron para neutralizar el efecto de la enzima y se llevaron a un frasco y se lavaron por centrifugación, luego se llevó a cabo el recuento celular utilizando la solución de azul tripán, y se sembraron en la proporción de 100000 células por mililitro, el volumen de 1 ml por placa fue completado con dos mililitros más de DMEM. Cuando estos cultivos alcanzaron la subconfluencia fueron recontadas nuevamente las células obtenidas y teñidas mediante Giemsa.

Contaje celular.

El día 13 de cultivo antes de realizar el sub-cultivo se llevó a cabo un contaje del número total de células vivas que teníamos en cada cultivo con y sin NRG respectivamente. Tomamos 10 microlitros de cada uno de ellos que fueron teñidos con azul tripán para posteriormente realizar el contaje de células vivas mediante el empleo de una cámara de Neubauer. Las células totalmente teñidas de azul fueron excluidas, ya que eran células muertas en las que la solución había sido capaz de introducirse en su interior.

Las placas fueron lavadas con PBS entre las 48 - 96 horas y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego el paraformaldehído fue retirado y se lavaron nuevamente con PBS, tres veces, cinco minutos cada vez. Posteriormente se realizó la tinción de Giemsa y se visualizaron a través del microscopio de campo claro. Se fotografiaron 7 campos entre las dos placas y se llevó a cabo una estimación del número de CS obtenidas teniendo en cuenta las características morfológicas de las mismas. Las células que no tenían la forma típica se clasificaron como “otras células”. El campo fotografiado con un objetivo de 10X es 0,2932 mm² y el diámetro de la placa de cultivo es de 35 mm, es decir, presenta un

superficie de 962,112 mm². El contaje se llevó a cabo sobre dos placas con NRG y dos sin NRG a las 48 horas (día 15), siguiendo el procedimiento y tinción referidos anteriormente. El resto fueron resuspendidas y congeladas para realización de futuros estudios.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS CULTIVOS

Inicialmente partimos de una placa enriquecida con NRG y una placa sin la misma, ambas sometidas previamente a 7 días de predegeneración. El día 13 de cultivo, cuando se obtuvo la confluencia de las células fueron sub-cultivadas en cuatro placas de cultivo con NRG y otras cuatro sin la misma. En dicho momento se llevó a cabo el contaje así como a las 48 horas del sub-cultivo (Día 15).

La mayoría de las células observadas presentaban una morfología alargada bipolar con soma ovalado en el que el núcleo ocupa la mayoría de éste y muestran unos nucleolos de pequeño tamaño (Figura 1). Estas células tienden a hacer contacto entre sus extremos formando “cadenas” o a constituir conglomerados celulares entorno a otros tipos de células. Así pues, el cultivo observado estaba compuesto mayoritariamente por células con el típico aspecto de CS.

Junto a estas CS aparecía un pequeño porcentaje de células fusiformes con características fibroblásticas cuya proporción era menor en los cultivos adicionados con NRG según se explicara en el apartado siguiente referido a los datos cuantitativos.

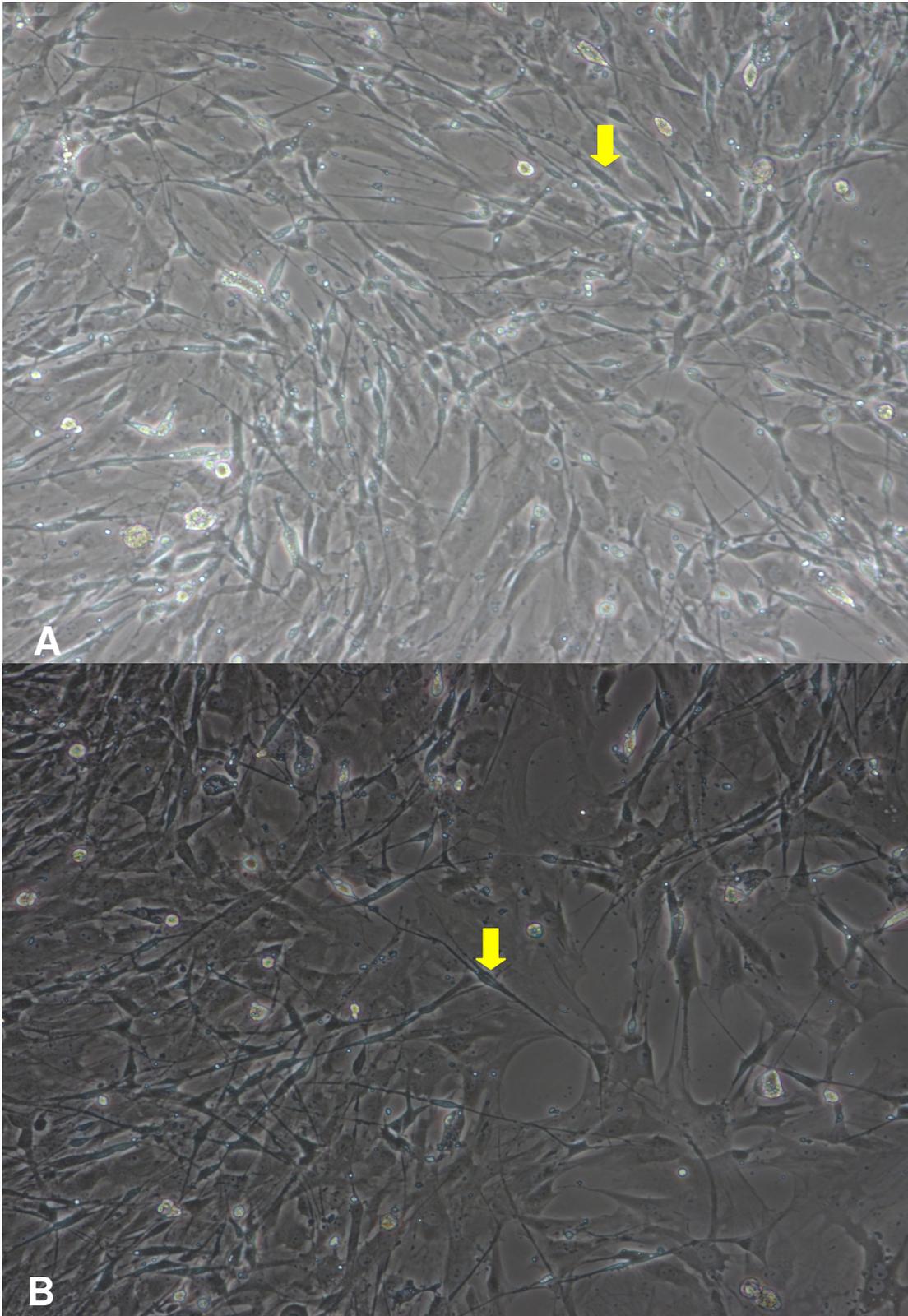


FIGURA 1. (A) Cultivo de células de Schwann con NRG a los 13 días de cultivo. (B) Cultivo de células de Schwann sin NRG a los 13 días de cultivo. La población predominante en ambos casos corresponde a CS (flecha). 10X

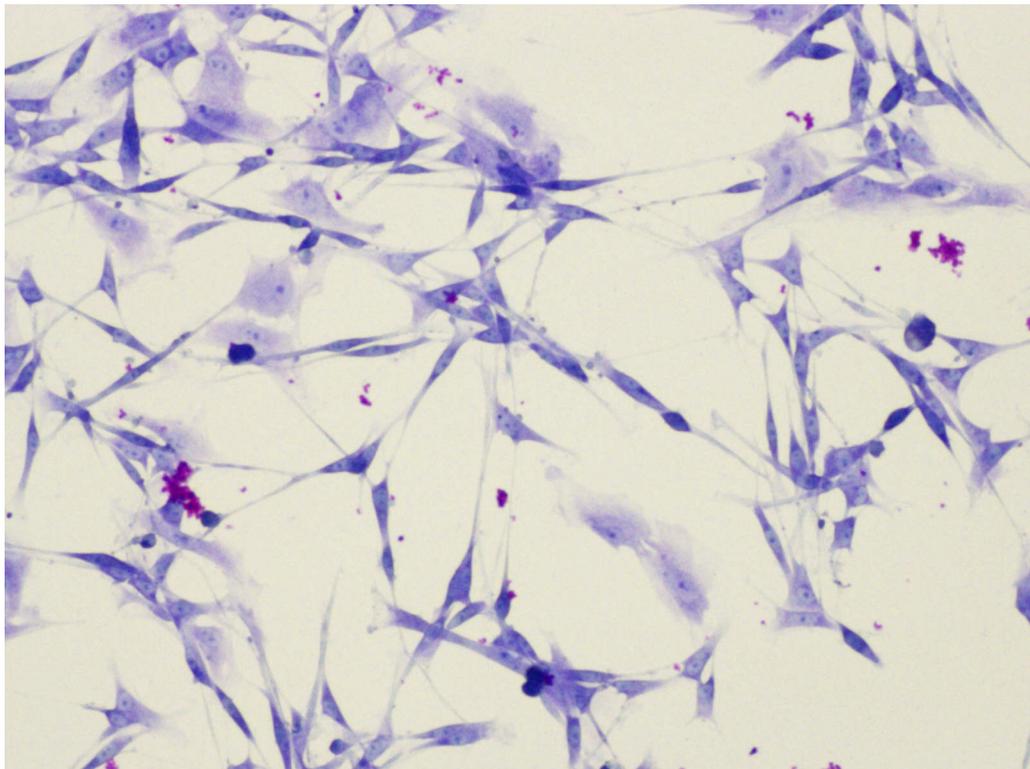


FIGURA 2. Células de Schwann prodecentes del Nervio Ciático de rata cultivadas en un medio enriquecido con NRG, y teñidas con Giemsa a las 48 horas de sub-cultivo (día 15). Las CS presentan una morfología alargada y cada célula se une a otras de la misma estirpe formando cadenas. 10X

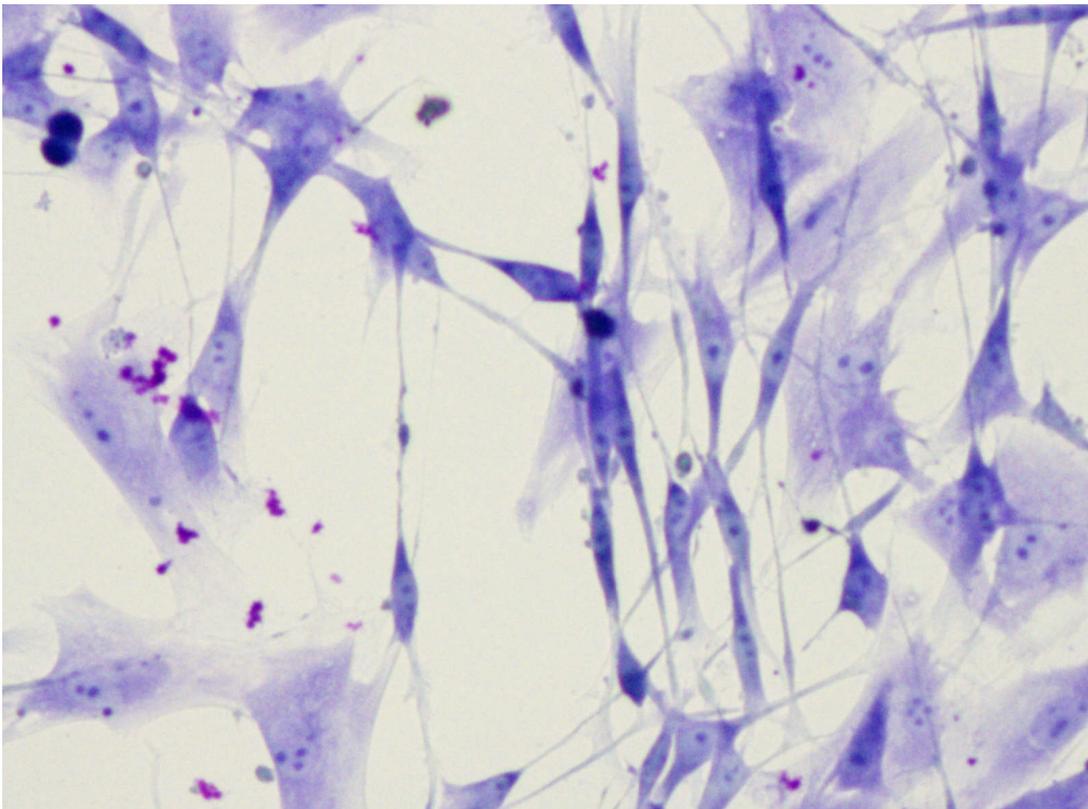


FIGURA 3. CS formando cadenas por conexión entre sus extremos a las 48 horas de sub-cultivo (día 15). Giemsa. 20X

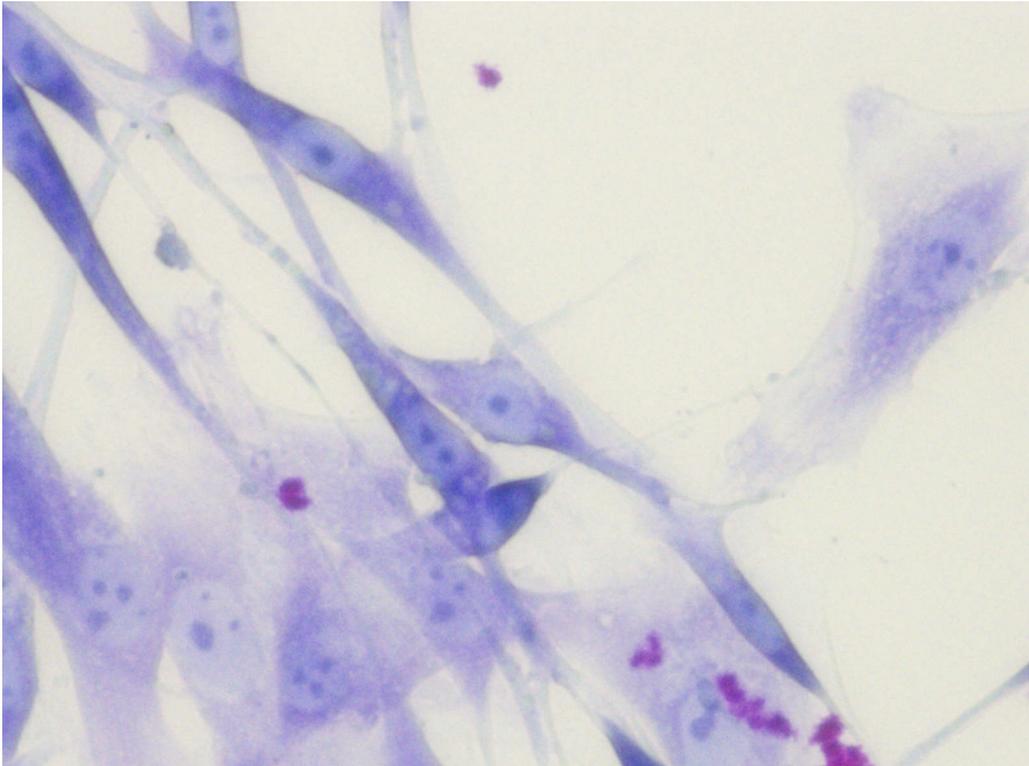


FIGURA 4. Sub-cultivo de CS con NRG a las 48 horas (día 15). CS con su morfología característica alargada, se puede visualizar la presencia de varios nucléolos en cada célula y la conexión de sus prolongaciones con CS vecinas. Giemsa. 40X.

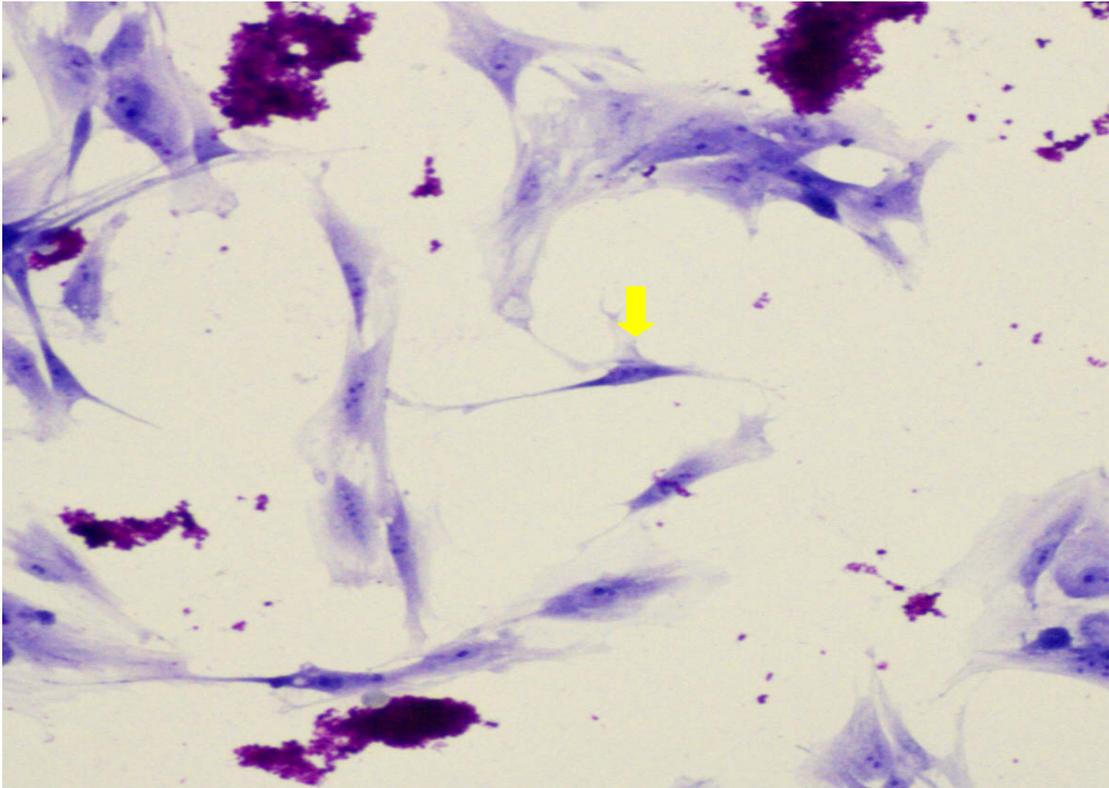


FIGURA 5. Sub-cultivo de CS sin NRG a las 48 horas (día 15). CS con morfología triangular. Giemsa. 10X.

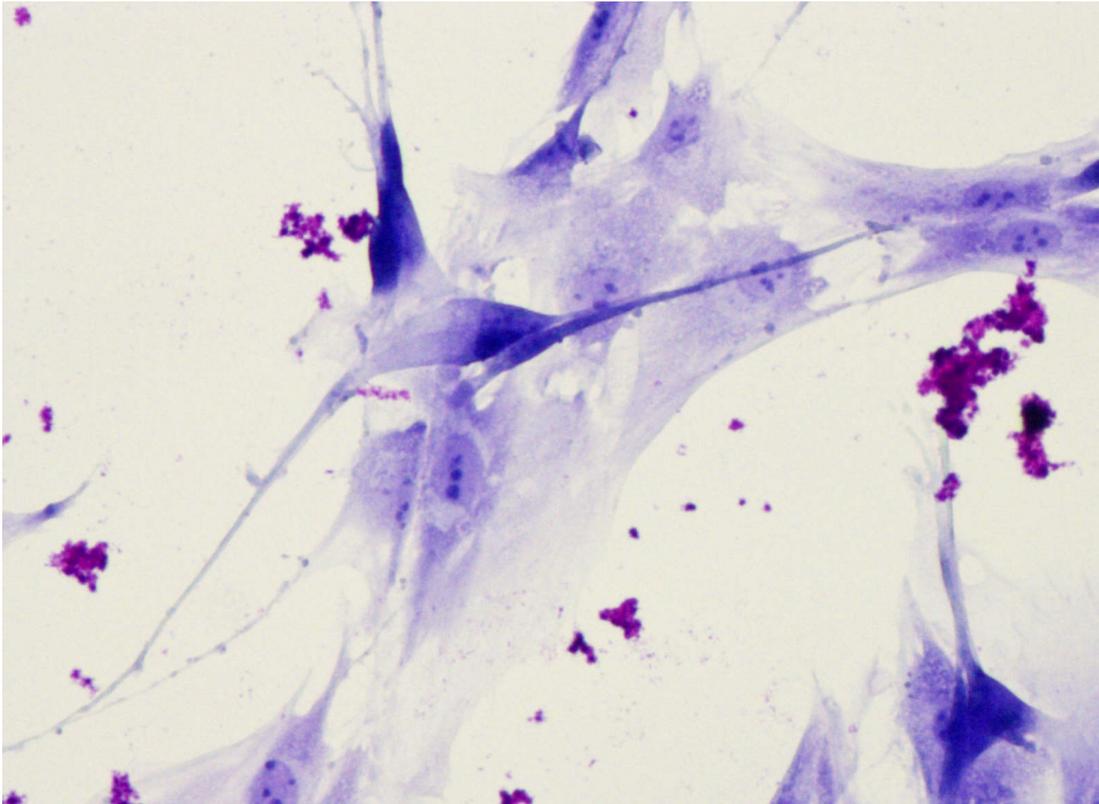


FIGURA 6. Sub-cultivo de CS sin NRG a las 48 horas (día 15). Las CS mantienen mismas características morfológicas que las CS cultivadas con NRG y pueden observarse formando agregados celulares. Giemsa. 20 X

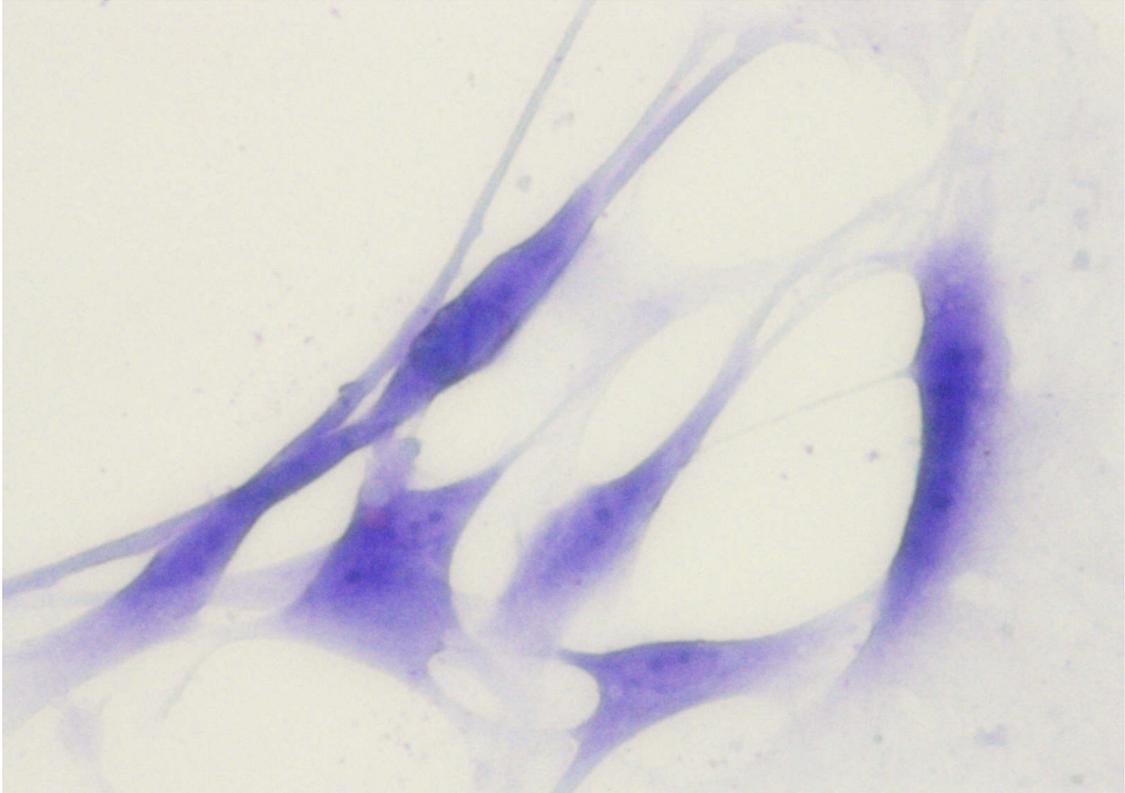


FIGURA 7. Sub-cultivo de CS sin NRG a las 48 horas (día 15). CS de morfología alargada con prolongaciones que interconexionan entre diferentes células. Giemsa. 40 X

4.2. ESTUDIO CUANTITATIVO DE LOS CULTIVOS.

PROLIFERACIÓN CELULAR (Tabla 1)

En el día 13 del cultivo realizado a partir del Nervio Ciático y tras sus siete días de pre-degeneración se llegó a la confluencia de las células, es decir, al menos el 80% de la superficie de la placa de cultivo estaba ocupada por las mismas. En ese momento se llevó a cabo un conteo de las células obtenidas en los dos cultivos, con y sin neurregulina. Empleamos para ello una cámara de Neubauer que nos permitió cuantificar el número de células vivas que teníamos en nuestros cultivos.

Tras desprender y homogeneizar las células se tomaron 10 microlitros y se les añadió azul tripán para posteriormente cuantificar el número de células vivas. Así aquellas que estaban teñidas totalmente de azul eran excluidas, ya que eran células muertas en las que la solución añadida había sido capaz de introducirse en su interior. Mediante este procedimiento se calculó en el cultivo de CS con NRG entorno a 1 millón de células (1.000.000) mientras que en el que no tenía NRG crecieron cuatrocientas mil células (400.000)(Gráfico 1).

Aunque en este momento no se llevó a cabo un conteo del número de CS obtenidas en uno y en otro medio sí se pudo comprobar a través del microscopio invertido como en el primero de los cultivos no solamente existía un mayor número de células como demostró el conteo sino que predominaba la estirpe de las células de Schwann.

Posteriormente se llevó a cabo el sub-cultivo de las CS de los dos medios. Cada placa fue sub-cultivada siguiendo su adición o no de NRG.

A las 48 horas del sub-cultivo (día 15 de cultivo) se llevó a cabo el conteo celular; así, partiendo de que nuestra siembra en las cuatro placas de los dos grupos fue homogénea. De cada grupo dos placas, fueron fijadas para tinción y otras dos placas fueron congeladas para realizar futuro estudios. A partir de una de estas últimas se llevó de nuevo un conteo del total de células obtenidas mediante el sub-cultivo en cada grupo. En el de NRG se obtuvieron 540.000 células por placa (Gráfico 2) siendo el total de las mismas este grupo de 2.160.000 células (Gráfico 3).

En el grupo que no tenía NRG en el medio de cultivo se obtuvieron 210.000 células por placa (Gráfico 2) y basándonos en la homogeneidad de nuestra siembra el total de células en este grupo fue de 840.000 células (Gráfico 3).

En el sub-cultivo que contenía NRG la media de CS obtenidas por campo el día 15 fue de $85,42 \pm 17,6$ células siendo el total de CS obtenidas 1.121.048 (Gráfico 3). En el

otro grupo, sin NRG, las CS por campo fueron de $29,71 \pm 9,71$ y el total de 389.960 (Gráfico 3).

Estos datos muestran como la NRG facilitó en gran medida la proliferación celular en general y de las CS en especial.

TIPO DE CULTIVO	Variable	Cél/placa	Total Cél	Pureza (%)	CS / campo	Total CS
<u>Primario</u>	Con NRG/13d	1.000.000	1.000.000			
	Sin NRG/13d	400.000	400.000			
<u>Sub-cultivo CS</u>	Con NRG/48h (Día 15)	540.000	2.160.000	51.9 %	$85,42 \pm 17.36$	1.121.048
	Sin NRG/48 h (Día 15)	210.000	840.000	46,40%	$29,71 \pm 9.71$	389.960

TABLA 1. Proliferación celular. Estudio cuantitativo de los cultivos.

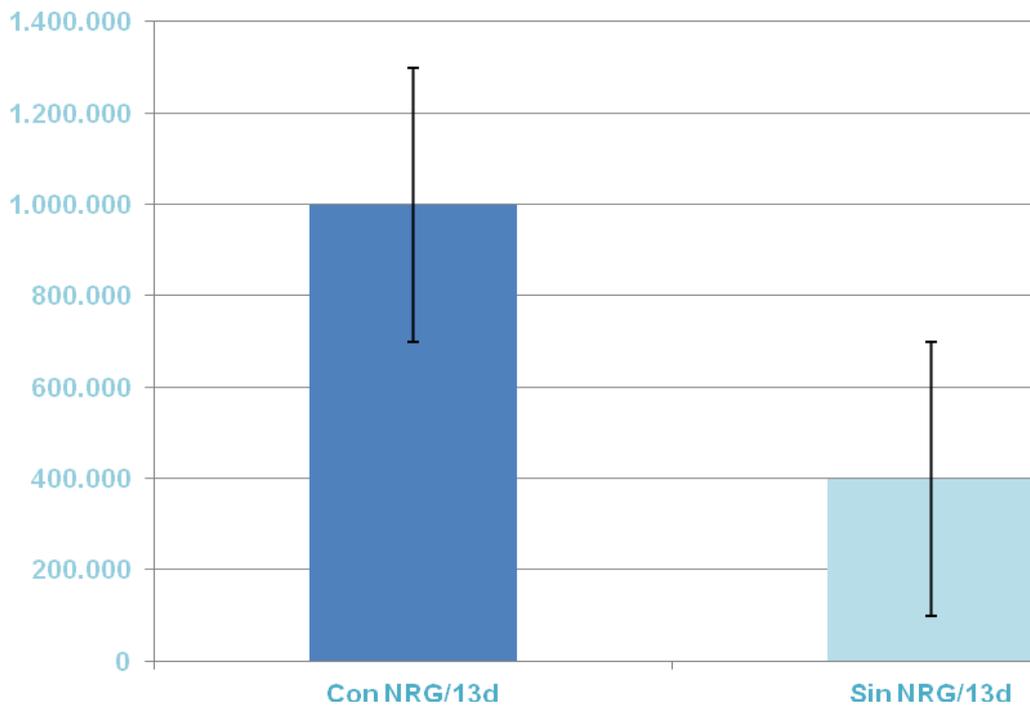


Gráfico 1. Número total de células en cultivo el día 13.

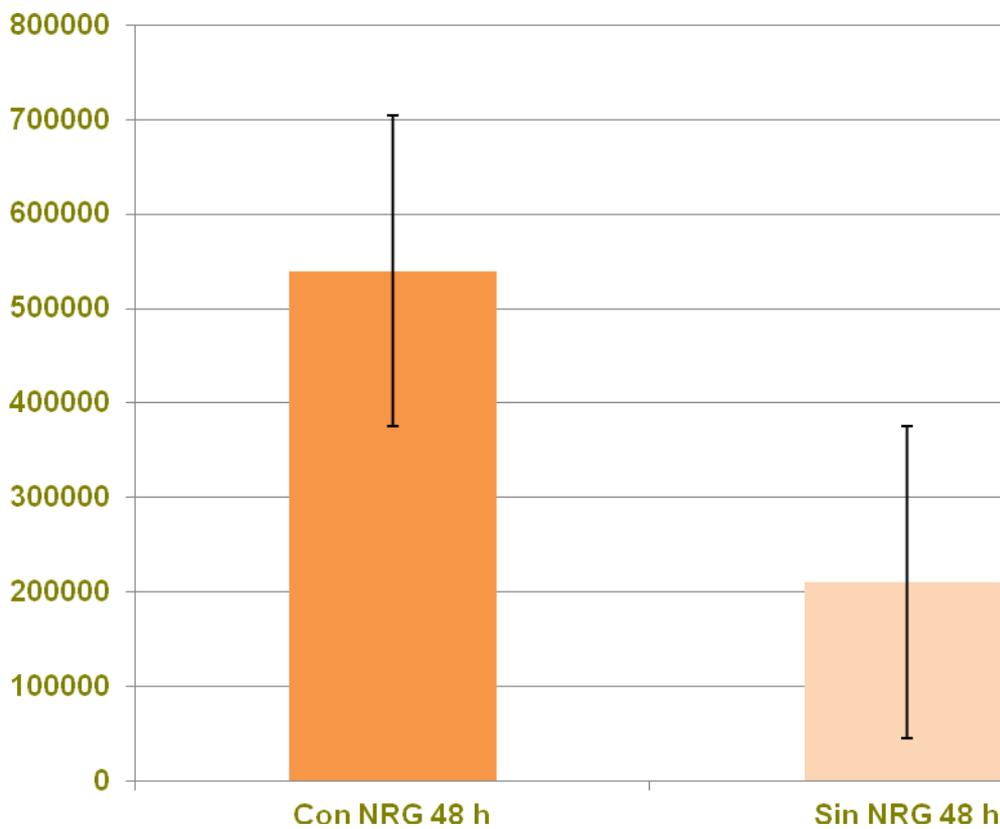


Gráfico 2. Células por placa de subcultivo. Día 15

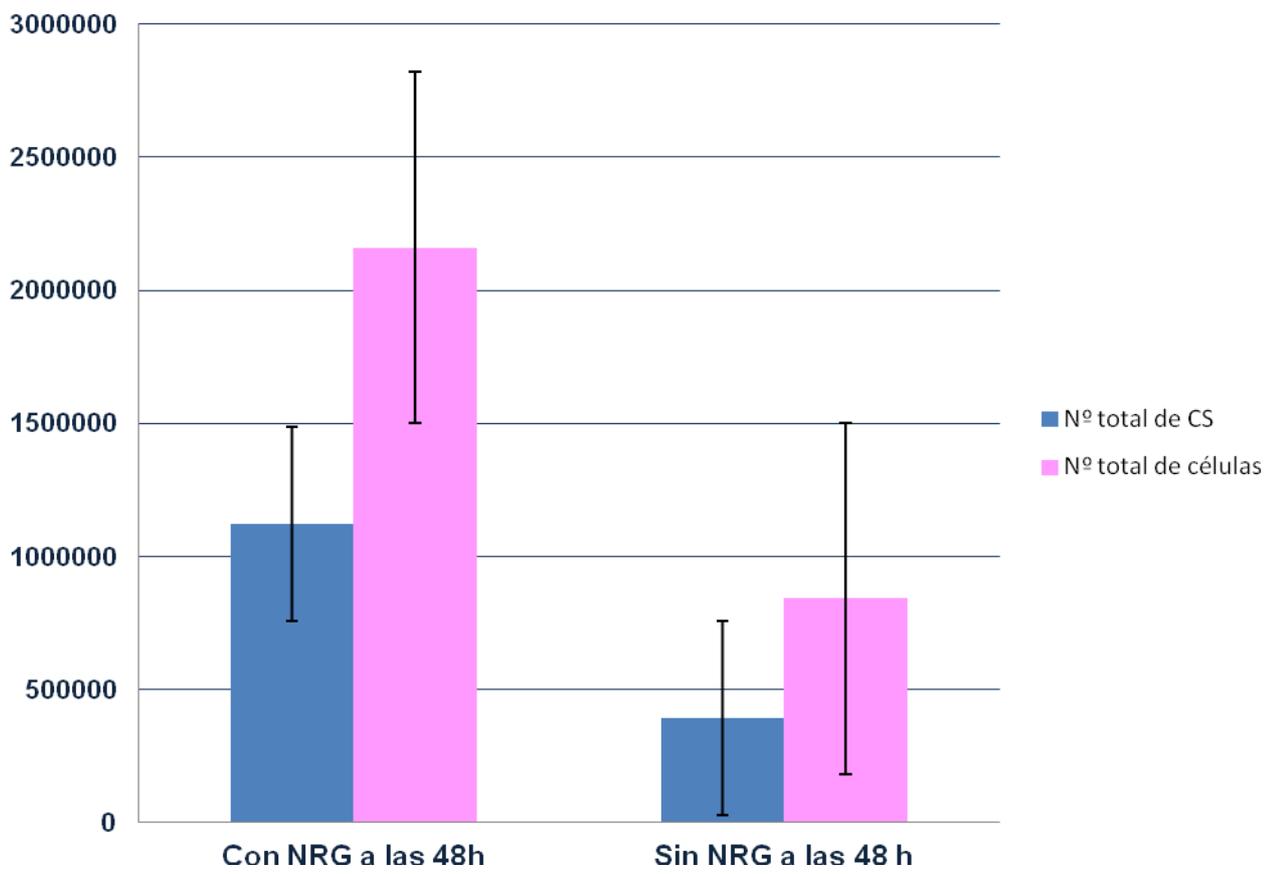


Gráfico 3. Sub-cultivo de CS. Día 15

5. DISCUSIÓN

El cultivo de CS obtenidas a partir de animales de experimentación adultos es más complicado de llevar a cabo que el de CS procedentes de animales jóvenes. Esto es debido a la dificultad para mantener el cultivo y el bajo rendimiento del mismo debido a la pobre proliferación que presentan estas células, todo ello unido al sobrecrecimiento de los fibroblastos que condicionan una baja pureza de los cultivos. A todo lo anterior hay que sumar el riesgo de infección de cultivos que impediría el crecimiento de nuestras células (3,10,20). La principal ventaja que presentan estas células es su mayor semejanza a las del hombre adulto que es el que principalmente padece la mayor parte de las lesiones en las que podrían ser empleadas como ayuda en la terapéutica (10,16, 46, 47, 48, 49).

A lo largo de los años se han intentado emplear diferentes técnicas para soslayar las dificultades referidas anteriormente. Así se han mejorado las condiciones de asepsia tanto en los quirófanos de extracción de nervio como a la hora de manipular los fragmentos obtenidos y posteriormente los cultivos resultantes. De gran ayuda ha sido su manipulación en cabinas de flujo laminar o el empleo de antibióticos y antimicóticos en los medios empleados para el cultivo. Así y todo la infección de los cultivos es un evento que ocurre no infrecuentemente.

Debido a que los cultivos primarios son pobres en células, para aumentar el rendimiento de nuestro cultivo, obteniendo una mayor proliferación de CS y mayor pureza del mismo llevamos a cabo una pre-degeneración in-vitro del nervio durante 7 días. Esta técnica fue descrita por Morrissey et al. en 1991(50), aunque era realizada de forma diferente a la que llevamos a cabo en nuestro estudio que se asemeja a la descrita por Manent et al. en 2003 (45).

Mediante la predegeneración no solamente estimulamos el crecimiento de CS sino también de otras células como los fibroblastos, que presentan mayor capacidad de proliferación y pueden llegar a contaminar el cultivo e impedir el crecimiento de nuestras células objetivo. Para estimular el crecimiento de las CS que presentan menor capacidad proliferativa que los fibroblastos añadimos al medio de cultivo (SBF al 10% más antibiótico) y ensayamos en un grupo experimental el efecto de neurregulina en dicho grupo (3,20).

La neurregulina es un factor de crecimiento con función autocrina y paracrina producido “in vivo” por las CS y por los axones (51,52); presenta un función trófica

sobre las CS aumentando su proliferación hasta en 4 veces a la vez que se aumenta la pureza del cultivo (3,51,52).

En nuestro cultivo al igual que en otros realizados con anterioridad y que podemos encontrar en la literatura (3, 20, 45), hemos podido demostrar los efectos beneficiosos de las técnicas descritas anteriormente y cómo mediante la predegeneración junto con neurregulina se ha obtenido una mayor proliferación celular. Así pudimos estimar una proliferación celular en el cultivo sometido a predegeneración con neurregulina de un millón de células frente a cuatrocientas mil células en el que no se añadió el factor de crecimiento. Es realizado el conteo mediante visualización de los cultivos con microscopio invertido en el que se pudo observar una mayor proliferación de CS en el primer cultivo respecto al segundo, como se ha indicado.

De igual manera, al sub-cultivar las CS con y sin neurregulina una vez alcanzada la confluencia de la placa pudimos observar cómo la proliferación de CS era mayor en los sub-cultivos que habían sido realizados en un medio rico en neurregulina (51,52), obteniéndose un mayor número de CS por campo de cultivo y menor proliferación de fibroblastos. La media de CS por campo obtenidas en el cultivo con factor de crecimiento fue de $85,42 \pm 17.6$ frente a $29,71 \pm 9,71$ células en el que no había sido realizado con dicho factor. Así pudimos demostrar el importante papel trófico que presenta la neurregulina sobre la proliferación de las CS, obteniendo un mayor rendimiento de los cultivos.

Además hemos podido observar mediante la visualización con la tinción de Giemsa como las CS mantenían sus características tanto en uno como en otro cultivo, presentando una morfología alargada, con un soma y un núcleo ovalado con varios nucléolos y prolongaciones que tienden a establecer conexión con las CS vecinas (5,6,7).

Por lo tanto, es importante llevar a cabo futuros estudios para el perfeccionamiento de la técnica de extracción así como de cultivo de CS para obtener un mayor rendimiento de los mismos, aumentando su pureza y consiguiendo una mayor proliferación de las CS, ya que estas células podrían ser empleadas en la terapéutica de múltiples enfermedades que afectan al adulto.

6. CONCLUSIONES

1. La técnica de pre-degeneración resulta muy útil para la obtención de cultivos de CS, obteniéndose mayor proliferación celular cuando se adiciona neurregulina.
2. Las CS cultivadas en medios de cultivo enriquecidos con neurregulina mantienen las características típicas de las CS.
3. La neurregulina aumenta el rendimiento de los sub-cultivos de CS, obteniendo una mayor cantidad de estas células y una mayor pureza de los cultivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Moore K, Persaud T. Embriología clínica. 6ª ed. Mexico: Interamericana; 2005.
2. Ziegler L, Grigoryan S, Yang IH, Thakor NV, Goldstein RS. Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2):394-403.
3. De la Fuente I, Alcalde I, Gamboa OL, Garrosa M, Gayoso MJ. A method for obtaining Schwann cell cultures from adult rabbit nerve based on "in vitro" pre-degeneration and neuregulin treatment. *Histol Histopathol.* 2012;27:95-102
4. Castaneda RT, Khurana A, Khan R, Daldrup-Link HE. Labeling stem cells with ferumoxytol, an FDA-approved iron oxide nanoparticle.. *J Vis Exp.* 2011 4:e3482.
5. Jessen K, Mirky R. Origin and early development of Schwann Cells. *Microsc Res Tech.* 1998; 41:393-402
6. Welsch U. Histología Sobotta. 2ª ed. Madrid: Panamericana; 2009
7. Gartner L, Hiatt J. Texto Atlas de Histología. McGraw Hill Interamericana; 2007.
8. Ross M, Kaye G, Paulina W. Histología, texto y atlas. 4ª ed. Buenos Aires; 2005.
9. Maturana LG, Zanon RG, Pierucci A, Vidal BC, Oliveira AL. Supraorganized collagen enhances Schwann cell reactivity and organization in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44:682-687.
10. Lehmann HC, Chen W, Mi R, Wang S, Liu Y, Rao M, Höke A. Human Schwann cells retain essential phenotype characteristics after immortalization. *Stem Cells Dev.* 2012;21:423-431.
11. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194:1-14.
12. Bosse F. Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration. *Cell Tissue Res.* 2012;349:5-14.
13. Kingham PJ, Terenghi G. Bioengineered nerve regeneration and muscle reinnervation. *J Anat.* 2006; 209: 511-526
14. Zhang P, He X, Liu K, Zhao F, Fu Z, Zhang D et al. Bone marrow stromal cells differentiated into functional Schwann cells in injured rats sciatic nerve. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2004;32:509-518

15. Abe K, Namikawa K, Honma M. Inhibition of Ras extracellular-signal-regulated kinase (ERK) mediated signaling promotes ciliary neurotrophic factor (CNTF) expression in Schwann cells. *J neurochem.* 2011;77:700-703
16. Iwase T, Jung CG, Bae H, Zhang M, Soliven B. Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J Neurochem.* 2005; 94: 1488-1499
17. English AW, Meador W, Carrasco DI. Neurotrophin-4/5 is required for the early growth of regenerating axons in peripheral nerves. *Eur J neurosci.* 2005;21: 2624-2634
18. Jangouk P, Dehmel T, Hörste GM, Ludwig A, Lehmann HC, Kieseier BC. Involvement of ADAM in axonal outgrowth and myelination of the peripheral nerve. *Glia.* 2009; 5:19-21
19. Bustamante J. *Neuroanatomía Funcional*, segunda edición, editorial Celsus, Bogotá, 1994;38-42
20. Haastert-Talini K. Culture and proliferation of highly purified adult Schwann cells from rat, dog, and man. *Methods Mol Biol.* 2012;846:189-200.
21. Zhou LN, Zhang JW, Wang JC, Lei WL, Liu XL, Zhou LH. Bone marrow stromal and Schwann cells from adult rats can interact synergistically to aid in peripheral nerve repair even without intercellular contact in vitro. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 Sep 20.
22. Thorpe TA. History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol.* 2007 Oct;37:169-180.
23. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1907;4: 140-143
24. Carrel A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J.exp med.* 1912;15: 519-528
25. Butler M. *Animal Cell Culture and Technology*. 2° ed. London- New York: Bios Scientific Publishers; 2004.
26. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature.* 1975;256:495-497.
27. Thompson JA, Itskovitz J, Shapiro S, Warnitz M, Swiergiel J, Marshall V et al. Embryonic Stem Cell derived from human blastocysts *science.* 1998;282:1145-1147
28. Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 2010 Jun;15:93-103.

29. Pfister LA, Papaloïzos M, Merkle HP, Gander B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. *J Peripher Nerv Syst.* 2007 Jun;12:65-82.
30. Herbst RS. Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004; 59:21-26.
31. Van Dam PS, Aleman A. Insulin-like Growth Factor-I, cognition and brain aging. *European Journal of Pharmacology* 2004; 490: 87-95.
32. Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* 2001; 23: 494-507.
33. Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G602-G611.
34. Wiedlocha A, Sorensen V. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 286: 45-79.
35. Pasche B. Role of Transforming Growth Factor β in cancer. *J Cell Physiol* 2001; 186: 153-168.
36. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte Growth Factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney int* 2001; 59: 2023-2038
37. Plate KH. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Med* 2001; 7: 151-152.
38. Lecouter J, Kowaiski J, Foster J, Hass P, Zhang , Dillard-Telm L, Frantz J, Rangell L, Deguzman L, Keller G, Peale F, Gurney A, Hillan K, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001; 412: 877-884.
39. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 475-486.
40. Murray MR, Stout AP. Characteristics of human Schwann cells *in vitro*. *Anat. Rec.* 1942; 275-285.
41. Anselin AD, Corbeil SD, Davey DF. Succesfully culturing Schwann cells from adult peripheral nerve. *Acta Quirúrgica Austriaca*, 1998; 30 sup. 35:321-332.
42. Mauritz C, Grothe C, Haastert K. Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells. *Journal of Neuroscience Research.* 2004; 77:453-461.

43. Kreider BQ, Corey- Bloom J, Lisak RP, Doan H, Pleasure DE. Stimulation of mitosis of cultured rat Schwann cells isolated by differential adhesion. *Brain Res.* 1982;237:238-243.
44. Hanemann CO, Rosenbaum C, Kupfer S, Wosch S, Stoegbauer F, Müller HW. Improved culture methods to expands Schwann cells with altered growth behavior from CMTA patients. *Glia.* 1998; 232: 89-98.
45. Manent J, Oguievetskaia K, Bayer j, Ratner N, Giovannini M. Magnetic cell sorting for enriching Schwann cells from adult mouse peripheral nerves. *J Neurosci Methods.* 2003; 15 123: 167-173.
46. Aghayan HR, Arjmand B, Norouzi-Javidan A, Saberi H, Soleimani M, Tavakoli SA, Khodadadi A, Tirgar N, Mohammadi-Jahani F. Clinical grade cultivation of human Schwann cell, by the using of human autologous serum instead of fetal bovine serum and without growth factors. *Cell Tissue Bank.* 2012;13:281-285.
47. Sango K, Kawakami E, Yanagisawa H, Takaku S, Tsukamoto M, Utsunomiya K et al. Myelination in coculture of established neuronal and Schwann cell lines. *Histochem Cell Biol.* 2012;137:829-839.
48. Sango K, Yanagisawa H, Takaku S, Kawakami E, Watabe K. Immortalized adult rodent Schwann cells as in vitro models to study diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:374943. Epub 2011 Jun 13.
49. Afshari FT, Fawcett JW. Astrocyte-Schwann-cell coculture systems. *Methods Mol Biol.* 2012;814:381-391.
50. Morrissey T, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci.* 1991; 11: 2433- 2442
51. Raabe TD, Clive DR, Neuberger TJ, Wen D, DeVries GH. Tured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins. *J Neurosci Res.* 1996; 46: 263-270.
52. Carrol SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbet JA. Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci.* 1997; 1642-1659.