



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
DE LA SALUD: FARMACOLOGÍA, NEUROBIOLOGÍA Y  
NUTRICIÓN

**Valoración cuantitativa del crecimiento del  
cultivo de células de Schwann de rata**

Autora:

**María Rodríguez Blanco**

Tutor:

**Dr. D. Manuel Garrosa García**

Valladolid, Septiembre de 2014

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>

# RESUMEN

---

Estudios recientes han demostrado que las células de Schwann (SCs) son necesarias en la regeneración en el sistema nervioso periférico (SNP) y podrían también dar soporte a la regeneración en el sistema nervioso central (SNC). Por esto, el trasplante autólogo de SCs es uno de los tratamientos propuestos para la reparación de lesiones nerviosas y en nervios y médula espinal, siendo, por tanto, necesario desarrollar un método seguro y eficaz para la obtención de SCs en una cantidad suficiente, con una alta pureza y en un periodo de tiempo relativamente corto permitiendo así su aplicación clínica. En este trabajo se estudia el cultivo de SCs procedentes de nervio ciático de ratas adultas llevando a cabo una predegeneración *in vitro* previa de los nervios durante un periodo de 7 días tras el cual se disociaron y cultivaron utilizando como medio de cultivo Dulbecco modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de antibiótico-antimicótico y neurregulina (NRG1- $\beta$ 1) 10 nM (8  $\mu$ L/ml), que favorece la proliferación de las células de Schwann frente a los fibroblastos, siendo la contaminación por estas células uno de los principales problemas para la obtención de SCs. Mediante la caracterización morfológica de las células y el estudio inmunohistoquímico se pudo confirmar que se obtenían SCs y que la máxima cantidad de células se obtenía tras un periodo en cultivo de entre 14 y 21 días, corroborándose así los resultados obtenidos por otros autores. Así mismo, también se pudo confirmar que el mitógeno utilizado, la NRG1- $\beta$ 1 favorece el crecimiento de las SCs. Por tanto, se tiene un método sencillo que permite obtener altas cantidades de SCs en un tiempo adecuado utilizando un medio sin elementos que puedan dar lugar a posibles efectos adversos en un contexto clínico.

# INTRODUCCIÓN

---

Las SCs son un tipo de glía del SNP que se encarga de envolver a los axones neuronales en los nervios, constituyendo así fibras nerviosas, que pueden ser mielínicas o amielínicas. Las SCs confieren a los axones soporte metabólico y trófico y ejercen un papel esencial en la velocidad de conducción del impulso nervioso.

Cada vez se están conociendo más funciones de las SCs y de su equivalente en el SNC, los oligodendrocitos, no previstas anteriormente como la regulación de propiedades sinápticas, control del microambiente periaxonal de iones, funciones inmunomoduladoras y quizás el mantenimiento de células troncales. Además, después de una lesión, las SCs dirigen la regeneración axonal en el sistema nervioso periférico promoviendo y dirigiendo el crecimiento de axones así como restaurando las uniones neuromusculares. Recíprocamente, diferentes señales axonales regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación de las SCs (Beirowski, 2013).

Las SCs por tanto, van a interactuar con los axones en el sistema nervioso periférico de vertebrados. Estas interacciones son esenciales para la formación y función de las fibras nerviosas periféricas. Durante el desarrollo, los axones promueven la generación de SCs vía trófica y mitogénica. Las SCs por su parte, regulan la integridad y la organización funcional de los axones. Esta dependencia mutua persiste en el individuo adulto lo cual contribuye a la vulnerabilidad de las fibras mielínicas a una gran variedad de desórdenes clínicos ya que la patología de uno de los dos elementos afecta a la función del otro (Salzer, 2012).

En un principio, se asumió que las SCs eran pasivas en la naturaleza. Sin embargo, las observaciones experimentales han cambiado radicalmente este concepto. Las evidencias sugieren que las SCs son excitables, capaces de percibir actividad neuronal y de generarla para soportar y controlar la función neuronal (Samara et al., 2013).

## **-Origen y diferenciación de las células de Schwann**

Las células de la neuroglia en el sistema nervioso periférico, incluyendo las células satélites en los ganglios periféricos y las SCs en los troncos nerviosos, derivan de las células de la cresta neural. En los vertebrados, durante el desarrollo, emergen de la parte dorsal del tubo neural, desde donde migran a varios puntos dentro del embrión. Dependiendo del ambiente, las células de la cresta neural van alcanzando gradualmente destinos restringidos dando lugar a células del sistema nervioso sensitivo y autónomo, así como a distintos tipos celulares no nerviosos.

Algunas células de la cresta neural son totipotentes, lo cual se ha demostrado mediante análisis clonal en cultivo e *in vivo*. Además, clonaciones en serie han revelado que algunas células de la cresta neural tienen características de células troncales como la capacidad de auto-renovación. Estas células troncales derivadas de la cresta neural (NCSCs) pueden aislarse de distintas estructuras de la cresta neural. Particularmente, NCSCs pueden encontrarse en lugares de gliogénesis como el nervio ciático y ganglios de la raíz dorsal (DRG). La multipotencia y la capacidad de auto-

renovación también se manifiestan en células que expresan marcadores gliales tempranos como P0, PMP22 y erizo del desierto (Dhh).

La especificación glial y la diferenciación se dan en estados tempranos del desarrollo embrionario. En los nervios espinales, la generación de las SCs es un proceso prolongado que involucra dos estados embrionarios transitorios: primero se da la gliogénesis, durante la cual las células de la cresta neural NCSCs se diferencian a precursores de las células de Schwann (SCPs). Estos precursores darán lugar a las células de Schwann inmaduras que posteriormente se diferenciarán en células de Schwann mielínicas y amielínicas (Woodhoo and Sommer, 2008).

### ***Paso de NCSCs a SCPs***

Todavía no se conoce cómo se especifican exactamente las NCSCs a SCPs. Se ha propuesto que la gliogénesis puede darse por defecto cuando la neurogénesis u otros destinos alternativos están suprimidos.

Uno de los factores implicados es Sox10. Las NCSCs deficientes en Sox10 son incapaces de alcanzar un destino glial. Sox10 se expresa virtualmente en todas las NCSCs migratorias y postmigratorias, lo que indica que Sox10 por sí sola no es suficiente para la determinación de un destino glial. Lo que va a hacer Sox10 es regular la multipotencia y la decisión del destino glial de las NCSCs de una manera dependiente del contexto mediante la alteración de su capacidad de respuesta a las señales extracelulares. Además, Sox 10 va a afectar a la respuesta de las células de la cresta neural a otros factores implicados en la gliogénesis como NRG1 ya que va a regular la expresión de sus receptores. NRG1 es importante ya que promueve la gliogénesis a expensas de otros posibles destinos.

Sin embargo, puede haber rutas de señalización alternativas. En embriones mutantes, la falta de señalización NRG1 puede ser compensada por otras señales gliogénicas en ganglios pero no en los nervios periféricos. Un factor candidato para esta compensación es la señalización por Notch, que, de forma similar a NRG1, puede hacer que las NCSCs alcancen un destino glial.

A parte de estos mecanismos compensatorios, hay una segunda posible explicación para los diferentes efectos de las vías NRG1 y Notch en la glia satélite y en las SCs: los distintos linajes celulares necesitan factores específicos para su desarrollo. En términos de supervivencia, estudios *in vitro* muestran que el desarrollo de células satélite y SCPs tienen requerimientos distintos (Woodhoo and Sommer, 2008).

### ***Paso de SCPs a SCs inmaduras***

El siguiente paso en la generación de las SCs es la diferenciación de los SCPs a SCs inmaduras por señales de los axones.

Los SCPs son distintos de sus precursores, las NCSCs, y su progenie, las células de Schwann inmaduras, en varias de sus características fenotípicas, incluyendo marcadores moleculares y su respuesta a determinados factores de crecimiento. Por ejemplo, los SCPs se distinguen de las NCSCs por la expresión *in vivo* de BFABP, P0 y Cadherina-19 entre otros. Además, los requisitos de

supervivencia de estos dos tipos celulares difieren significativamente al analizarlos *in vitro*. Por otro lado, los SCPs son antigénicamente muy diferentes de las células de Schwann inmaduras.

Hay una serie de señales que se sabe, o se cree, que están asociadas con los axones incluyendo la NRG1, endotelinas y la vía de señalización Notch, y que pueden regular los cambios fenotípicos asociados con esta transición. Diversos estudios muestran que la NRG1 es necesaria tanto para mantener la supervivencia de los SCPs como su maduración a SCs. Notch también puede acelerar la generación de SCs inmaduras a partir de SCPs. La eliminación de esta señal retrasa la generación de SCs inmaduras, por tanto, la señal Notch es un regulador positivo de la maduración de los SCPs con un importante papel en la generación de SCs.

Otra señal que puede estar involucrada en esta transición es la endotelina, actuando a través del receptor de la endotelina B. Tanto la endotelina como el receptor están presentes en el desarrollo de los nervios. Aunque la exposición a endotelina promueve la supervivencia de los SCPs, su maduración a SCs ocurre muy lentamente. Además, la maduración de los SCPs, en presencia de NRG1 y endotelina, se da en tasas menores que únicamente en presencia de NRG1. Estos datos pueden sugerir la existencia de un antagonismo entre la endotelina y la NRG1 en la maduración de los SCPs. Mientras que la NRG1 promueve la generación de las SCs *in vitro*, la endotelina la retarda.

Los SCPs se pueden diferenciar a fibroblastos o SCs por lo que es interesante conocer qué señales les permiten elegir entre estos dos destinos. Una posibilidad son los cambios que se producen en el ambiente inmediato por la reorganización de la citoarquitectura durante el desarrollo de los nervios. Los fibroblastos aparecen aproximadamente al mismo tiempo que la estructura estrechamente empaquetada de los nervios cambia a una más débil, con deposición de una matriz extracelular. Esto puede hacer que algunas células de la glia en estos nervios pierdan contacto con axones y queden desnudas en los espacios extracelulares. Si este fuera el caso, es plausible que las células que mantienen el contacto con los axones dieran lugar a SCs, lo cual está de acuerdo con todas las observaciones que muestran que son necesarias señales de los axones en la generación de SCs. Además, es probable que estas señales de los axones sean capaces de suprimir la diferenciación de los SCPs en fibroblastos endoneurales porque ya se ha demostrado que dos de estas señales, NRG1 y Notch, suprimen la generación de células parecidas a fibroblastos en el linaje de la cresta neural. Estos SCPs que no están asociados con los axones podrían no estar expuestos a estas señales y su diferenciación a fibroblastos podría no ser inhibida. Además, la exposición a factores profibroblastos de la matriz extracelular puede ser también importante (Woodhoo and Sommer, 2008).

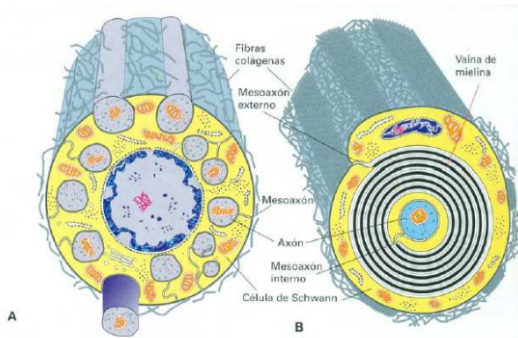
### **Paso de SCs inmaduras a SCs maduras**

Por último, las SCs inmaduras tienen que experimentar profundos cambios fenotípicos para diferenciarse a SCs mielínicas y amielínicas.

Los axones de gran diámetro, experimentan el proceso de clasificación radial y establecen una relación 1:1 con SCs individuales, preparándose para la mielinización. Los axones de menor diámetro, están destinados a permanecer amielínicos y están

rodeados por SC amielínicas, la mayoría acomodadas en depresiones a lo largo de la superficie, aunque un número significativo de células amielínicas también se encuentran en relación 1:1 con los axones. La clasificación radial depende de las interacciones entre las lamininas presentes en la lámina basal que rodean las SCs y sus receptores, integrinas  $\beta_1$  presentes en las SCs. Recientemente una GTPasa Rac1 de la familia Rho se ha identificado como una de las moléculas que intervienen en este proceso.

Los fenotipos moleculares de las SCs mielínicas y amielínicas son similares, al menos en su morfología y en la expresión de los marcadores antigénicos con la excepción de GalC y las integrinas  $\alpha_1\beta_1$  y  $\alpha_7\beta_1$  que se expresan solo en las SCs amielínicas. Por tanto, es de esperar que haya algunos cambios moleculares que acompañen la diferenciación de las SCs inmaduras. La generación de SCs mielínicas, tiene lugar con cambios moleculares mucho más profundos, la mayoría de los antígenos asociados con las SCs inmaduras son inhibidos y hay una activación de una serie de genes asociados con el control de la mielinización y con la formación de las vainas de mielina. El establecimiento de estas vainas a lo largo del diámetro de los axones permite la rápida conducción saltatoria de los impulsos nerviosos a lo largo de ellos (Woodhoo and Sommer, 2008).



Esquema que representa los dos tipos de fibras nerviosas

A Fibras amielínicas

B Fibras mielínicas

**Figura 1. (A)** En las fibras amielínicas, a lo largo del axón, se asocian una serie de SCs, tantas como hagan falta para cubrir la longitud del axón. Cada SC se asocia con varias prolongaciones y deja un mínimo espacio entre ella y la fibra, sellando ese espacio y dando lugar a los puntos de sellado conocidos como mesoaxones. En esta fibra no hay contacto directo entre prolongación nerviosa y SCs porque hay tejido conjuntivo entre ambas. **(B)** En cuanto a las fibras mielínicas, una sucesión de SCs forman una vaina de mielina. En el SNP una SC mieliniza un solo axón, mientras que en el SNC un oligodendrocito mieliniza varias prolongaciones. La vaina de mielina no es continua: presenta unas zonas donde no hay mielina, los nodos de Ranvier. Las zonas

donde sí hay mielina se denominan internodos. En la región internodal se sitúa la vaina de mielina, que es más gruesa cuanto más grueso es el axón y el internodo es más largo cuanto más largo es el axón (Modificado de "Organografía microscópica humana". Facultad de Medicina. UCM).

### -Mielinización

La identificación de las señales de los axones que promueven la formación de las vainas de mielina es un tema de interés considerable con importantes implicaciones terapéuticas. Hay dos hipótesis alternativas propuestas: o bien un tamaño crítico de los axones desencadena la mielinización, o, alternativamente, distintas señales bioquímicas producidas por los axones son las responsables del destino que alcanzan. Estas dos posibilidades no son excluyentes ya que las fibras más anchas podrían expresar determinadas señales y presentarlas en niveles más altos a las SCs debido a la mayor expansión de su membrana.

Datos recientes sugieren que estos dos tipos de axones son diferentes bioquímicamente y que el responsable que determina el destino que alcanzan los axones es la cantidad del factor de crecimiento NRG1 que expresan (Salzer, 2012).

Las NRGs constituyen una familia de factores de crecimiento codificados por cuatro genes (*NRG1-4*) que actúan a través de receptores erbB tirosin kinasa y contienen dominios similares a EGF, que son esenciales para su actividad. La NRG1 es la más estudiada. Se han descrito al menos 31 isoformas de la NRG1 humana que se generan por splicing alternativo y usan diferentes sitios de inicio de la transcripción. Las isoformas se diferencian por los extremos N-terminales y en función de estas diferencias se clasifican en seis tipos de los cuales los más estudiados son los tipos I a III (Fricker and Bennett, 2011).

### ***NRG1 y mielinización***

El diámetro de los axones determina si un axón es mielinizado y el grosor de la vaina de mielina. Además, la NRG1 es un factor derivado de los axones que es clave en la formación de la vaina de mielina y en la determinación de su grosor.

La NRG1 es necesaria en el proceso de mielinización y sus niveles de expresión están relacionados con el destino de los axones, ya que los axones mielínicos expresan niveles de NRG1 tipo III mucho más altos que los amielínicos. Cuando hay una inactivación genética de la NRG1 tipo III hay una hipomielinización y también hay defectos en el agrupamiento de las fibras de Remak (amielínicas), por tanto, la expresión de la NRG1 en los axones de menor diámetro es también necesaria para el normal ensamblamiento de estos axones por la SCs amielínicas. Por su parte, la sobreexpresión de este factor da lugar a una hipermielinización. Estos resultados indican que la NRG1 tipo III es una señal informativa en la mielinización del SNP: se necesitan determinados niveles umbrales para desencadenar la mielinización de las SCs. Por encima de este umbral, la cantidad de mielina compacta formada es proporcional a los niveles de NRG1 tipo III (Salzer, 2012). La señal de mielinización es más potente cuando la NRG1 se presenta en la superficie axonal actuando de manera yuxtacrina. A pesar de esto, a determinadas concentraciones bajas, las isoformas solubles de NRG1 también pueden tener efectos promielinización *in vitro* (Fricker and Bennett, 2011). Todas las isoformas de la NRG1 son escindidas por metaloproteinasas. Esta escisión libera la mayor parte de los ectodominios de los tipos I y II, que funcionan como señales paracrinas. Por otro lado, la isoforma tipo III, tiene una secuencia N-terminal hidrofóbica y por esto queda retenida en la membrana del axón después de la escisión, funcionando como una señal yuxtacrina (Salzer, 2012) (Fig. 2A).

### ***Señalización NRG1 en las SCs***

Se han producido avances significativos en el entendimiento de las rutas de señalización que regulan los fenotipos de las SCs por la NRG1.

El proceso de mielinización es promovido por la NRG1 tipo III que se une a los heterómeros erbB2/3 en las SCs dando lugar a la fosforilación de las tirosinas, el reclutamiento de moléculas adaptadoras y la activación de una serie de vías de señalización. Las vías de señalización involucradas incluyen la vía PI3K-Akt, ERK1/2-

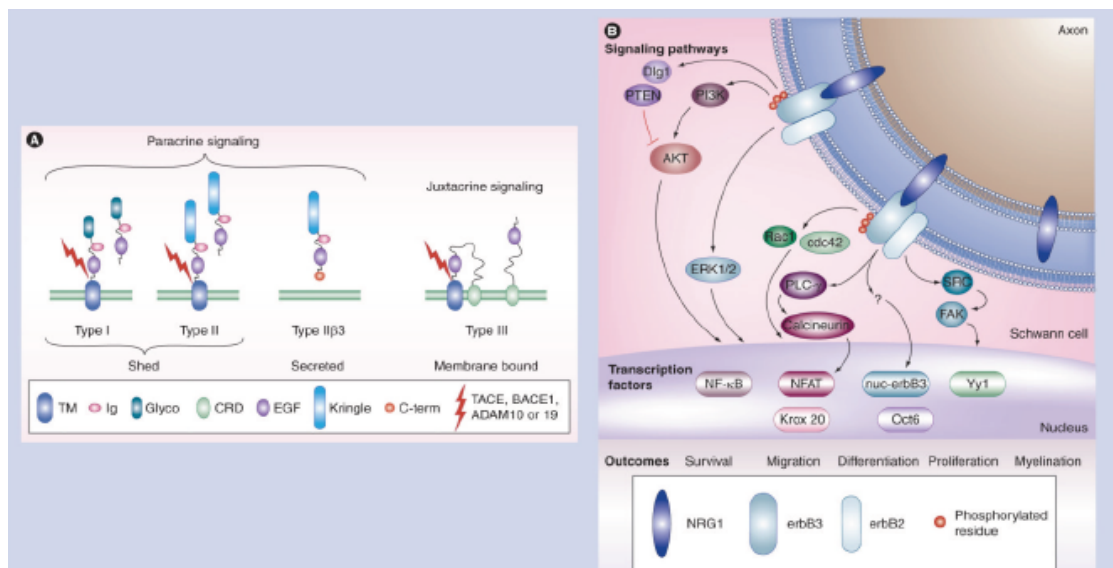


MAPK y la vía calcineurina-NFAT, así como GTAPasas, Cdc42 y Rac1 y las tirosin kinasas FAK y SRC.

Si se interrumpe la vía PI3K, se produce una inhibición de la proliferación de las SCs mediada por los axones y la mielinización *in vitro*, mientras que la activación de la MAPK y ERK por la NRG1 inhiben la expresión de los genes involucrados en la mielinización y por tanto, inhiben la mielinización *in vitro*. La vía calcineurina-NFAT regula positivamente la mielinización.

Además, la mielinización de las SCs es dependiente de un programa transcripcional. Determinados factores de transcripción como Oct6, NF-κB y Krox20 son reguladores positivos de la mielinización y su actividad permite la expresión de proteínas mielínicas incluyendo P0, MBP, PMP22, conexina 32 y la enzima implicada en la biosíntesis lipídica HMG-CoA.

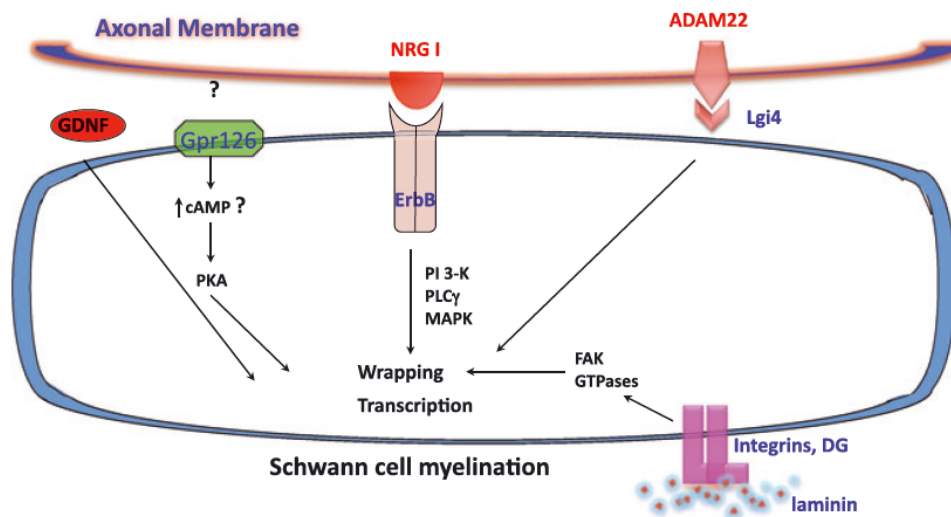
Recientes investigaciones han aumentado el conocimiento sobre cómo finaliza la mielinización, lo cual es importante ya que una mielinización excesiva es perjudicial. Existe una retroalimentación negativa en la señalización de la NRG1. Las señales de la NRG1 a través de la ruta PI3K/Akt inician la producción de mielina. Akt es inhibida por la actividad de la enzima PTEN. Esta enzima es importante ya que se ha visto que cuando hay una delección de PTEN en las SCs se produce una hipermielinización. La señal de la NRG1 aumenta la cantidad de Dlg1, que estabiliza PTEN reduciendo su degradación proteosómica, lo cual reduce la actividad de Akt permitiendo así la finalización de la mielinización (Fricker and Bennett, 2011) (Fig. 2B).



**Figura 2. Isoformas de Neuregulina-1 y señalización en el SNP (A) Isoformas de NRG1 expresadas en el SNP.** Las isoformas se clasifican en tipos dependiendo de la composición del dominio N-terminal. Los tipos I y II se encuentran ancladas en la membrana antes de ser escindidas y desplazadas y el tipo IIβ3 es directamente secretada. Todas estas señales se dan de manera paracrina. Las isoformas de tipo III sufren un proceso de escisión pero tienen un segundo dominio transmembrana que las mantiene ancladas a la membrana y estas también llevan a cabo una señalización yuxtacrina. TACE, BACE, ADAM10 y ADAM19 son capaces de escindir las isoformas de NRG1. **(B) Vías de señalización y los factores de transcripción controlados por NRG1-erbB2/3.** La NRG1 se une a los receptores erbB, dando lugar a la formación de heterodímeros y a la fosforilación de tirosinas presentes en el dominio intracelular de estos receptores, creando sitios de unión para proteínas adaptadoras y activando varias rutas de señalización. Estas rutas van a controlar la migración, supervivencia, proliferación diferenciación y mielinización de las SCs (Modificado de Fricker and Bennett, 2011).

Aunque actualmente la NRG1 es el determinante axonal de la mielinización de las SCs mejor caracterizado, hay otras señales extrínsecas que también son importantes. Otro sistema de señalización que se ha visto recientemente que está implicado en la interacción axones-SCs es Lgi4, que es secretado por las SCs y se une de forma paracrina a Adam 22 en los axones (Fig. 2B). Las interacciones Lgi4/Adam22 son críticas para el avance de las SCs a un estado pro-mielínico. También se ha visto que un receptor acoplado a proteínas G (Gpr 126) de las SCs es necesario para la mielinización y para la formación normal de las fibras de Remak, aunque no se sabe cuál es el ligando que se une a estos receptores ni si es expresado por los axones o no. Finalmente, el GDNF (factor neurotrófico derivado de la glia) también tiene un efecto promielinización, aunque no parece ser esencial para la mielinización.

Además de estas señales, la lámina basal, en particular las isoformas de la laminina, es una señal extrínseca necesaria para el empaquetamiento y la mielinización. La laminina funciona como una señal autocrina que conduce a la mielinización (Salzer, 2012) (Fig. 3).



**Figura 3. Resumen de las vías de señalización que regulan la mielinización.** Las señales implicadas en la promoción de la mielinización son la NRG1 de tipo III que se une y activa a los receptores erbB2/3 y ADAM22 que se une a Lgi4 que es secretada por la SC. Gpr126 se encuentra en la SC y su función puede ser aumentar los niveles intracelulares de cAMP y activar la PKA. El componente de la matriz extracelular, laminina, se une a integrinas y distroglicano en la SC para activar la kinasa de adhesión focal y los miembros de la familia Rho GTPasa. El factor de crecimiento GDNF también promueve la mielinización (Modificado de Salzer, 2012).

Una cuestión interesante surgida de estudios recientes es que las rutas de señalización pueden ser activadas durante la desdiferenciación de las SCs y contribuyen a la demielinización en neuropatías humanas. Estudios más recientes mostraron que los factores de crecimiento son reguladores positivos de las SCs y también, bajo determinadas circunstancias, pueden inhibir la mielinización e incluso dar lugar a la demielinización en co-cultivos mielinizadores. Una señalización aberrante durante la lesión puede regular de forma negativa la diferenciación de las

SCs y la demielinización puede no ser resultado solo de la pérdida de señales de promielinización desde el axón (Salzer, 2012).

### **-Cultivo de células de Schwann**

Muchos investigadores han trabajado con los cultivos celulares con el objetivo de hacer crecer tejido fuera del cuerpo intentando desarrollar un método adecuado para conseguirlo. Ya en 1897, Leo Loeb declaró haber cultivado tejidos fuera del cuerpo y más tarde, en 1902 desarrolló otro método para cultivar tejidos esta vez dentro del cuerpo, por lo que no se podía considerar estrictamente como un cultivo. El cultivo de tejidos fuera del cuerpo fue llevado a cabo por primera vez por Harrison (1907) que observó que el tejido embrionario de rana crecía con normalidad en linfa coagulada. Más tarde, Burrows, bajo la supervisión de Harrison, trabajó en la mejora de la técnica de cultivo de tejidos sustituyendo la linfa por plasma sanguíneo y gracias a esta modificación logró cultivar sistema nervioso central, corazón y tejido mesenquimatoso de embrión de pollo. En 1910 consiguieron cultivar *in vitro* tejidos de mamíferos adultos. En otro estudio, los mismos investigadores estudiaron las diferencias en los cultivos al utilizar varios tipos de medios. Se utilizaron medios plasmáticos autólogos, alogénicos y heterogénicos viéndose que el desarrollo de los tejidos era menor en el plasma heterogénico. Por otro lado, también se utilizó suero como medio de cultivo y se obtuvieron excelentes resultados tanto en suero autólogo como alogénico y también en suero heterogénico (Carrel and Burrows, 1911).

Siguieron desarrollando la técnica utilizando primero el método de Harrison que consistía en colocar pequeños fragmentos de tejido suspendidos en una gota colgante de plasma. Más tarde, se desarrolló un método de cultivo en placa, lo que permitió el cultivo de mayores cantidades de tejido. Utilizando esta técnica, los investigadores observaron una serie de hechos: se determinó que tejidos de pollo, rata, perro, gato y cobaya podían ser fácilmente cultivados *in vitro* y que en función de su naturaleza, generaban células conectivas o epiteliales que migraban desde el tejido hacia el plasma donde sufrían divisiones directas o indirectas formando capas continuas o cadenas; además, vieron cómo los fragmentos de tejidos podían rodearse a sí mismos por completo con nuevo tejido denso o las nuevas células podían extenderse por la superficie del medio. En cuanto a la vida de estos tejidos *in vitro*, se observó que variaba de 5 a 20 días pudiéndose prolongar realizando cultivos secundarios e incluso terciarios. Tras estos estudios, se pensó ya en la posibilidad de utilizar estos cultivos para una posterior regeneración de tejidos dañados (Carrel and Burrows, 1912).

Otro aspecto importante a tener en cuenta en los cultivos celulares son las fases por las que pasa un cultivo celular con el tiempo. Carrel y Burrows (1911) pudieron determinar la existencia de tres fases mediante la observación, mayoritariamente, de cultivos primarios de tiroides. La primera fase es el periodo de latencia, que comprende el tiempo desde la introducción del fragmento en el medio de cultivo hasta la aparición de las primeras células. Este periodo se mantenía de 12 a 72 horas y era dependiente de la edad del animal del que procedía el tejido y de algunos otros factores. La segunda fase, es el periodo durante el cual las células crecen activamente. Varía considerablemente, puede extenderse hasta 18 días y hay influencia de numerosos factores. En el caso de la glándula tiroidea, el crecimiento activo se producía de 6 a 8 días y tras exceder este tiempo, la proliferación continuaba

más lentamente. Observaron que durante la proliferación de las células el fragmento original se volvía progresivamente más claro y los alveolos se distinguían más fácilmente, efecto que achacaron a la migración de un gran número de células al medio, el cual, a su vez, se iba volviendo más oscuro. La tercera y última fase, es el periodo de muerte del cultivo, que se produce después de 10 a 18 días tras el cese completo de la multiplicación de las células. Al mismo tiempo, se observó cómo los orgánulos citoplasmáticos se agrupaban y aumentaban en número. Los bordes de las células se volvían más débiles produciéndose finalmente la desintegración de las células. La muerte celular está ligada a una serie de cambios que se producen en el plasma por las células en crecimiento. Los investigadores determinaron que esto podía deberse al agotamiento de los nutrientes, la acumulación de productos metabólicos o a ambos factores. Mediante el cultivo de la glándula tiroidea de mamíferos estos investigadores pudieron determinar que las células sobrevivían en cultivo durante dos semanas o más y que podían prolongar este periodo de tiempo mediante subcultivos (Carrel and Burrows, 1911).

A medida que avanzaba el estudio de los cultivos celulares, se vio la importancia de poder aislar una línea pura de un determinado tipo celular, por lo que los investigadores intentaron desarrollar técnicas para obtener estos cultivos celulares puros. Alexis Carrel, en 1912 estudió una técnica consistente en aislar células de un determinado tipo y propagarlas mediante repetidos pases. En los primeros días de cultivo de los tejidos, generalmente era imposible aislar células de un único tipo, sin embargo, tras varios pases, las células crecían más activamente extendiéndose sobre una mayor superficie pudiéndose clasificar morfológicamente las células pertenecientes a los distintos linajes. Se aislaban las células deseadas y se depositaban en un nuevo medio y tras permitir que las células se multiplicaran durante dos o tres días, se realizaba un segundo pase. Tras una serie de sucesivos pases, las células crecían juntas formando una capa densa. Se pudo observar crecimiento celular activo hasta 100 días después de la extirpación de los fragmentos originales del organismo. Por tanto, con este experimento, Carrel mostró cómo a partir de un tejido es posible aislar y propagar células de un determinado tipo celular (Carrel, 1912).

En cuanto al cultivo de SCs, numerosos estudios han demostrado que estas células son capaces de promover la regeneración nerviosa aumentando la síntesis de moléculas de adhesión en la superficie celular, mediante la producción de una membrana basal y favoreciendo la síntesis de factores neurotróficos y sus receptores (Hedayatpour et al., 2007). Por tanto, el principal prerrequisito para poder llevar a cabo terapias basadas en el uso de las SCs es obtener una población lo suficientemente grande de estas células en un corto periodo de tiempo, por lo que es necesario disponer de un método seguro y eficaz para obtener SCs en cultivo.

El aislamiento y la purificación de SCs son normalmente procesos complicados. La disociación del nervio produce una población mixta de SCs y de células parecidas a fibroblastos perineurales y endoneurales. Para purificar los cultivos de SCs, las células parecidas a fibroblastos tienen que ser eliminadas ya que presentan tasas de proliferación más altas y rápidas que las SCs y pueden llegar a sobrepasar a la población de SCs. Para acabar con este rápido crecimiento celular, se han desarrollado diferentes estrategias como el uso de drogas antimetabólicas (Kreider et al., 1981; Morrissey et al., 1995; Calderon-Martinez et al., 2002), adhesión diferencial

(Kreider et al., 1981), clasificación magnética (Manent et al., 2003) o inmunopanning (Haastert et al., 2009).

Uno de los factores a tener en cuenta en el cultivo de las SCs es la edad de las ratas de las que se obtienen los nervios. Muchos de los estudios realizados se han basado en la obtención de SCs a partir de ratas recién nacidas, ya que cuando se trabaja con tejidos adultos se tienen dificultades añadidas debido a que éstos presentan una abundante cantidad de tejido conectivo y mielina y, por tanto, en las preparaciones celulares se obtienen altos porcentajes de fibroblastos que pueden superar a la población de SCs. Fields y McMenamin (1985) describieron un método para obtener SCs de nervios ciáticos de ratas adultas realizando una digestión enzimática con colagenasa y obtuvieron preparaciones con un 10-30% de SCs. Posteriormente, se describió otro método (Scarpini et al., 1988), en el que se combinaban disociación mecánica y química y que suponía una modificación del procedimiento para neurofibromas humanos descrito previamente por Pleasure et al. (1986). Tras la disociación mecánica, se realizaba una disociación enzimática con colagenasa, hialuronidasa y dispasa y se observó que en el día 1 el porcentaje de SCs era del 92% y en el día 4, a pesar del rápido crecimiento de los fibroblastos en cultivo, el porcentaje de SCs todavía era del 80%.

Se han estudiado dos métodos para conseguir aislar SCs: o bien utilizar el nervio intacto o llevar a cabo una predegeneración previa y es con este último con el que se han obtenido mejores resultados. Cajal fue el primero que describió el método de predegeneración *in situ*, durante el cual el nervio era seccionado *in situ* para permitir que tuviera lugar la degeneración walleriana (De Felipe et al., 1991). Basándose en este método, se determinó que el tiempo óptimo para que tuviese lugar la predegeneración eran 7 días (Keilhoff et al., 1999). Por un lado, se ha estudiado la predegeneración *in vivo* en la que el extremo distal del nervio seccionado se deja en el animal durante algunos días antes de ser recogido para su implante o para cultivarlo. Se ha visto que este método permite obtener un mayor número de SCs con mayor pureza y capacidad de proliferación que aquellos que no se someten a predegeneración (Danielsen et al., 1994; Bertelli et al., 2006). Otro método consiste en llevar a cabo la predegeneración de los nervios *in vitro*. Después de 7 días los nervios se pueden disociar y cultivar (Keilhoff et al., 1999).

Además de estos métodos basados en la predegeneración *in vitro* o *in vivo* del tejido nervioso, como ya se ha comentado, también se han descrito métodos rápidos para generar cultivos altamente enriquecidos en SCs adultas sin llevar a cabo la predegeneración, sino disociando directamente el tejido. Por esto, se han realizado estudios comparativos (Mauritz et al., 2004) para determinar cuál es el mejor método para obtener un mayor porcentaje de SCs. Para esto, se trabajó con tres grupos, uno en el que no se sometía el nervio a la predegeneración, otro en el que se realizaba la predegeneración *in vitro* y, por último, otro en el que la predegeneración tenía lugar *in vivo*. En los tres casos, se llevó a cabo una digestión enzimática con colagenasa y dispasa y una disociación mecánica. Uno de los pasos críticos de este procedimiento fue la duración de la digestión enzimática y se vio que con una incubación de 20 horas se obtenía una pureza suficiente de SCs primarias, pero si solo se mantenían 4 horas, la cantidad de fibroblastos era mayor y la tasa de proliferación de SCs era considerablemente más baja. Los resultados obtenidos confirmaron que la cantidad de

SCs obtenida con predegeneración (*in vitro* o *in vivo*) era dos veces mayor que la obtenida sin realizar la predegeneración. Otro punto importante fue el medio de cultivo utilizado. Estudios previos se basaban en el uso de DMEM, DMEM/F12 Y RPMI 1640 y utilizaban medio con suero o pretratamiento con suero, pero en este estudio se observó que el crecimiento de fibroblastos era mayor si se usaba medio con suero y por esto, se probaron diferentes medios sin suero llegando a establecer que los resultados óptimos se obtenían utilizando medio de crecimiento de melanocitos con forskolina, FGF-2 y extracto de pituitaria bovina. Además, los estudios inmunohistoquímicos mostraron que era necesario un segundo enriquecimiento para obtener mayores cantidades de SCs. Uno de los procedimientos a utilizar es el llamado Cold Jet que se basa en la capacidad que presentan los distintos tipos celulares para adherirse a la superficie de cultivo. Los fibroblastos forman una capa en la placa de cultivo sobre la que las SCs forman una capa superficial. Por esto, estas células se pueden despegar fácilmente mediante un lavado con PBS enfriado con hielo y medio de cultivo enfriado con hielo. Los cultivos obtenidos de nervio ciático predegenerado y sometidos al protocolo Cold Jet, dieron lugar a un 90% más de SCs.

También para conseguir mejorar los cultivos de SCs se han utilizado distintas sustancias como extractos de pituitaria (Brockes et al., 1979), que es una importante fuente de factores de crecimiento, y neurregulinas (De la Fuente et al., 2012). Como ya se ha explicado, se cree que la NRG1- $\beta$ 1 en tejidos nerviosos participa en el control de la mielinización, en la proliferación, supervivencia y diferenciación de las SCs y también en la demielinización causada por las lesiones nerviosas.

Otros estudios se han centrado en determinar cuál es la concentración óptima de suero bovino fetal a utilizar en el medio de cultivo y para ello se probaron distintas concentraciones para estudiar el efecto en las SCs y en los fibroblastos y para conseguir lograr una mayor proliferación de SCs y la supresión de los fibroblastos, concluyéndose que una concentración del 10% de FBS favorece el establecimiento del cultivo, ya que facilita la unión de las células al sustrato y que una concentración del 2,5% de FBS era la adecuada para la proliferación de SCs y la supresión de fibroblastos (Hedayatpour et al., 2007).

# OBJETIVOS

---

1º Poner a punto el cultivo de células de Schwann de rata mediante predegeneración *in vitro*.

2º Cuantificar la pureza y rendimiento de dichos cultivos tras la adición de NRG1- $\beta$ 1.

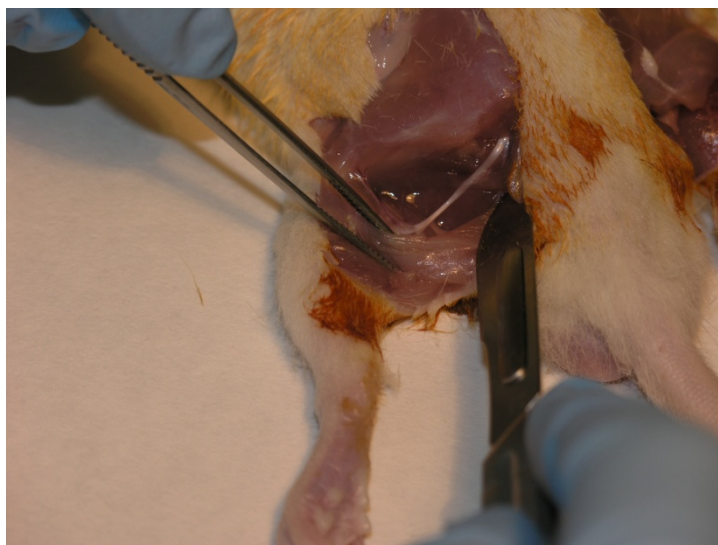
# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## **-Obtención de células de Schwann**

### ***Extracción del nervio ciático***

Se llevó a cabo la extracción de nervio ciático de seis ratas Wistar macho. Las ratas utilizadas tenían edades comprendidas entre los 1,5 y 4,5 meses y los siguientes pesos: 215 g, 310 g, 350 g, 367 g, 190 g, 163 g. Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal (1,5 ml por kilo de peso con una mezcla de Ketamina al 80%-Xilacina al 20%) en condiciones asépticas en un banco de trabajo estéril. Se les practicó una incisión de más o menos dos centímetros en la piel del muslo, y tras la retracción del músculo glúteo, queda así el nervio ciático expuesto. Posteriormente, se cortó proximalmente a la altura del tercio superior del muslo y distalmente en la zona próxima a la bifurcación tibia-peroné. De cada una de las ratas se extrajeron los dos nervios ciáticos. Cada uno de los nervios seccionados se llevó a una placa de cultivos de 3,5 cm (Falcon, ref 353001) que contenía una solución de Leibovitz con antibiótico-antimicótico, donde se limpió retirando el epineuro con ayuda de unas pinzas estériles y eliminando restos de sangre y otros tejidos. Después se troceó en porciones de 2 a 5 mm con un bisturí estéril.



**Figura 4. Disección para la extracción del nervio ciático.**

### ***Obtención de células por disociación del nervio extraído***

Las porciones de nervio extraídas se pasaron a placas de 3,5 cm con medio Dulbecco modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco ref 31885023) con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico-antimicótico y neurregulina 10 nM (8  $\mu$ L/ml), que favorece la proliferación de las células de Schwann frente a los fibroblastos. Se llevaron entonces a una estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad y se dejaron en predegeneración durante 7 días.

Al séptimo día se retiraron del medio y se introdujeron en un tubo (Falcon, ref 352005) que contenía 2 ml de solución de Leibovitz, antibiótico-antimicótico, 5% de



tripsina y 0,125% de colagenasa tipo II y se dejaron en este medio durante 3-4 horas en un baño a 37°C agitando manualmente cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó medio Dulbecco modificado con 10% de suero bovino fetal, 1% antibiótico-antimicótico y se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el sedimento obtenido se resuspendió en 1,5 ml de una solución del mismo medio. Esta solución se sembró en tres placas de 3,5 cm que contenía cada una 2,5 ml del mismo medio más 10 nM de neurregulina (8 µL/ml). Los medios de las placas se cambiaron 3 veces por semana.

### ***Cuantificación de las células de Schwann***

Cuando las células de Schwann alcanzaron una confluencia de al menos un 80% se llevó a cabo el subcultivo de estas células. Para realizar este procedimiento, primero se eliminó el medio de cultivo de las placas, se lavaron con solución de Hanks, añadida poco a poco, agitando levemente y se retira. Después se adicionó tripsina, que se deja actuar hasta que las células se desprenden. Una vez desprendidas las células, se añadió DMEM con 10% de suero bovino fetal y 1% antibiótico-antimicótico para detener la acción de la tripsina. Se pasó el contenido de las placas a un tubo (Falcon, ref 352005) y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento obtenido en 1 ml de DMEM. Posteriormente se sometieron a recuento celular utilizando una cámara de Neubauer y se resembraron en cantidad de  $2 \times 10^5$  células por placa, completándose con DMEM hasta 2,5 ml el volumen de la placa, y se llevaron a una estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad. Este procedimiento se realizó cada vez que las células de Schwann obtenidas de cada uno de los nervios extraídos alcanzaban una confluencia de al menos el 80%.

### ***Almacenamiento de las células de Schwann***

Una vez realizado el subcultivo de las células, se almacenaron las células sobrantes mediante su congelación. Para ello, primero se centrifugó el tubo en el que se tenía la suspensión celular a 2000 rpm durante 2 minutos. Una vez finalizado el centrifugado, se retiró el sobrenadante y se añadió medio de congelación. Tras homogeneizar, se pasó a un vial de congelación que se llevó en un contenedor de congelación (velocidad de enfriamiento de -1°C/minuto) a un equipo de -80°C.

### **-Caracterización de las SCs**

#### ***Morfología***

Para estudiar la morfología de las células sembradas, se llevó a cabo la tinción de Giemsa. Primero se retiró el medio de las placas que se iban a teñir y se lavaron con PBS y tras retirarlo, se añadió formaldehído al 4% que se dejó actuar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró y se volvió a añadir PBS para eliminar los restos de formaldehído. Se retiró el PBS y se aplicó la disolución de Giemsa al 20%, previamente preparada, dejándola actuar durante 30 minutos. Posteriormente, se volvió a lavar con PBS hasta que al retirarlo dejase de estar coloreado y se observaron las placas teñidas al microscopio.

### ***Inmunofluorescencia***

Se procedió también a la detección de las células de Schwann mediante tinción inmunohistoquímica para S-100 ya que las células de Schwann van a expresar esta proteína. Los primeros pasos son los mismos que los seguidos en la tinción de Giemsa. Se retiró el medio de las placas, se lavaron con PBS y se añadió formaldehído que actuó durante 10 minutos. Se lavaron con PBS otras dos veces y se añadió albúmina sérica bovina (BSA) y se incubaron las placas durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se aplicó el anticuerpo primario, S-100 monoclonal de ratón y se incubaron las placas a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron las placas con PBS tres veces y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario, inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con fluoresceína. Se dejaron las placas con este anticuerpo durante 1 hora y 20 minutos protegidas de la luz. Después, se volvieron a lavar las placas con PBS tres veces y se aplicó DAPI, que se dejó actuar durante 10 minutos en oscuridad. Por último, se lavaron las placas al menos cinco veces con PBS, se añadió PBS formaldehído y se puso un cubre sobre las placas para observarlo al microscopio de fluorescencia.

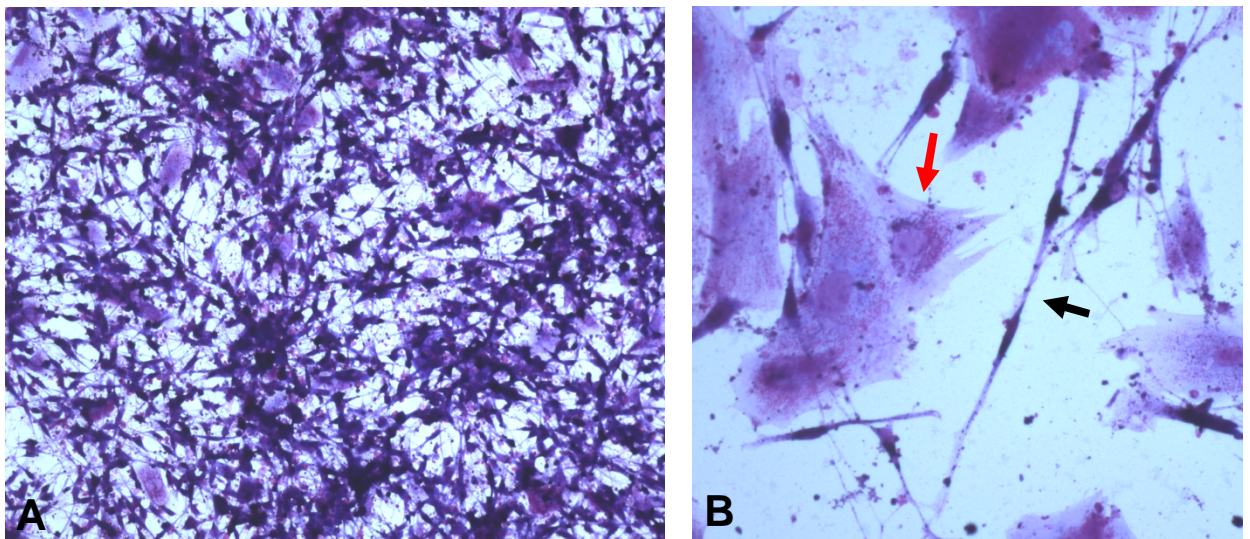
Se realizó el conteo de células de Schwann y del resto de células en el cultivo midiendo cuatro campos diferentes de una misma placa a 20 aumentos, y así determinar la pureza del cultivo.

# RESULTADOS

---

## -Caracterización morfológica de las SCs

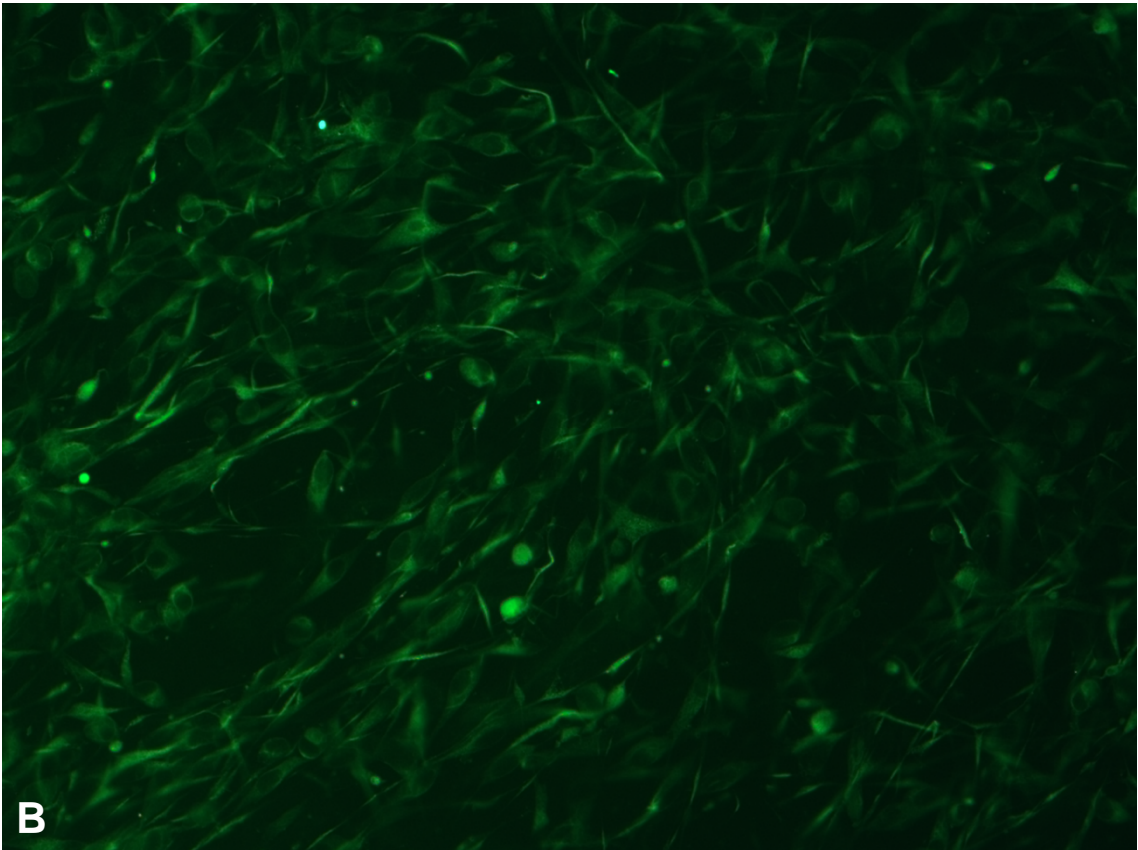
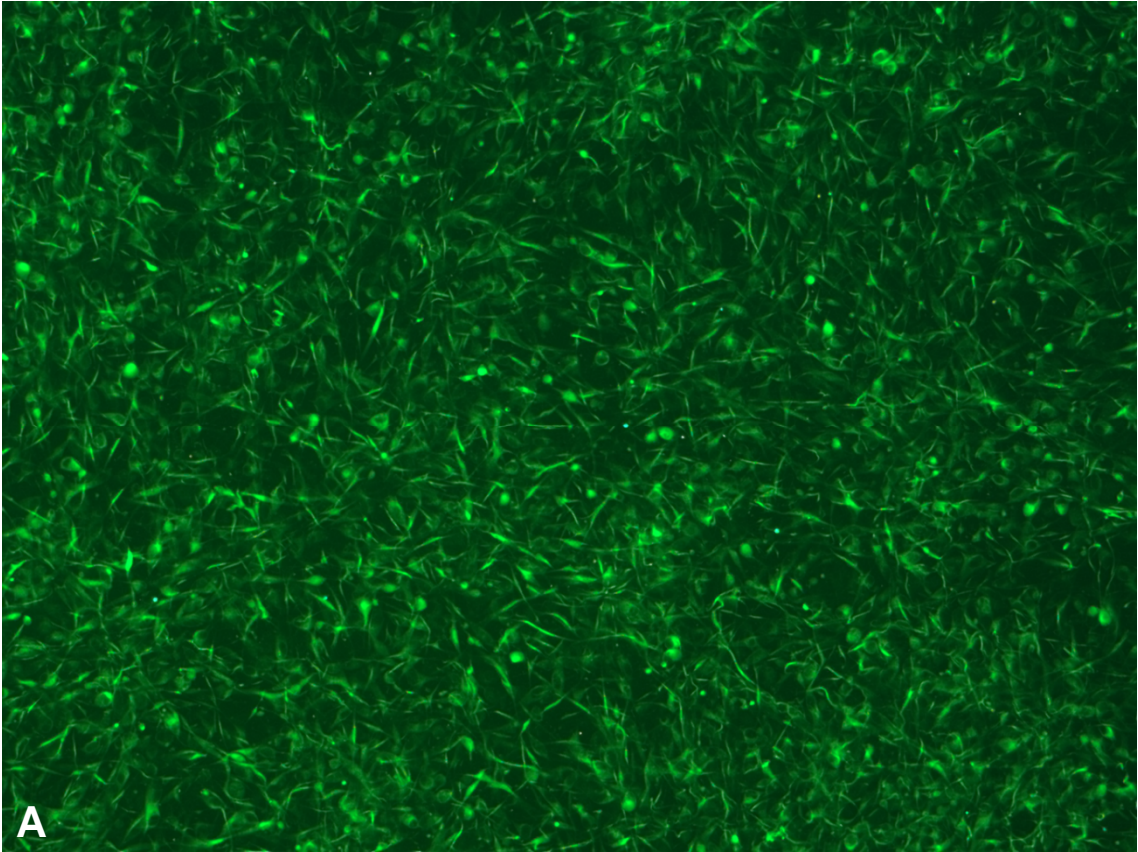
Para estudiar la morfología de las células sembradas se realizó una tinción Giemsa tras fijar las células. Tras aproximadamente 48 horas en cultivo, la mayoría de las células sembradas mostraban una típica morfología bipolar o, en algún caso, tripolar, de núcleo denso y alargado. Además estas células mostraban una fuerte tendencia a formar filas y alinearse unas detrás de otras. Por otro lado, también se pudo observar una minoría células que presentaban características de fibroblastos, con una forma más plana y polimórfica con un núcleo redondeado y grandes citoplasmas. A medida que se realizaban los pases, las SCs empezaron a mostrar una forma más ancha, triangular o poligonal.

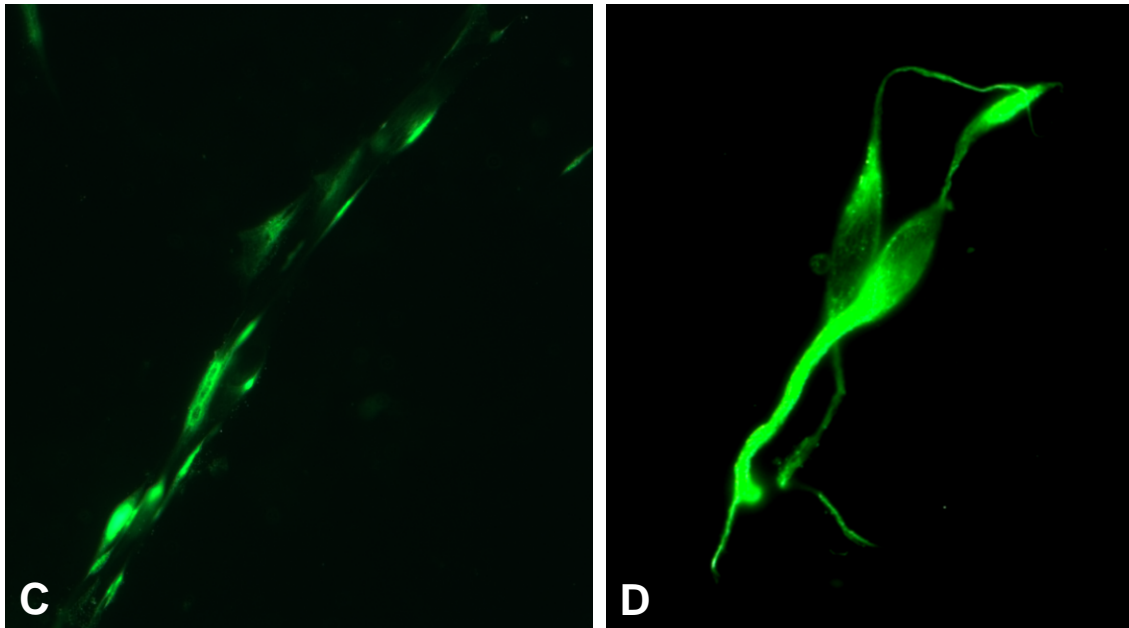


**Figura 5. Imagen al microscopio de células teñidas con la técnica de Giemsa. (A) Células de Schwann, pase 2 (x10).** Células cubriendo la placa con las características morfológicas típicas de las SCs. Junto a estas células, se pueden ver células con forma de fibroblastos. **(B) Células de Schwann y fibroblastos (x20).** Las SCs tienen forma alargada y tienden a alinearse unas detrás de otras (flecha negra). Los fibroblastos tienen mayor tamaño y una forma más plana, presentando grandes núcleos y citoplasmas más amplios (flecha roja).

## -Inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico mostró que la mayoría de las células eran S-100 positivas, es decir, presentaban inmunorreactividad al anticuerpo anti S-100 y mostraban la típica morfología alargada, tripolar o bipolar de las SCs, con un núcleo largo y ovalado y un citoplasma fino. Algunas células aparecían S-100 negativas y mostraban citoplasmas planos y grandes núcleos redondeados.





**Figura 6. Imágenes del microscopio de fluorescencia de células sometidas a tinción anti S-100. (A) Células de Schwann antes de realizar el tercer pase (x10).** Tras 21 días en cultivo, se tiene una gran cantidad de SCs, es decir, de células S-100 positivas. **(B) Células de Schwann antes de realizar el tercer pase, tras 21 días de cultivo (x20).** **(C) Células de Schwann formando filas (x40).** Las SCs tienden a alinearse unas detrás de otras formando filas. **(D) Células S-100 positivas (x40).** Las SCs se caracterizan por presentar una morfología fusiforme, con un núcleo largo y ovalado y un citoplasma fino.

### **Pureza**

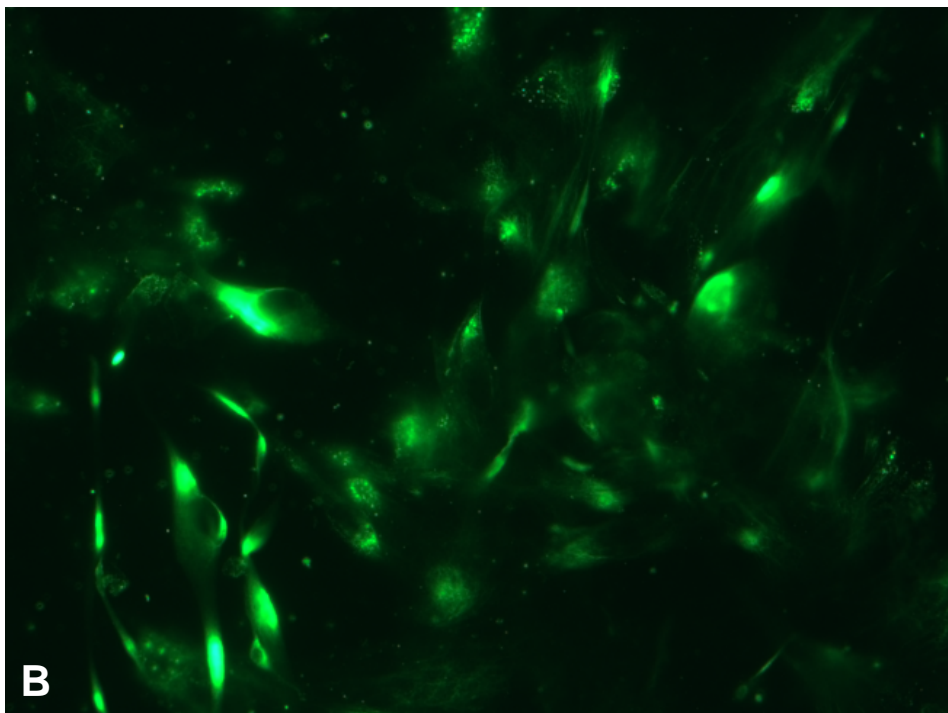
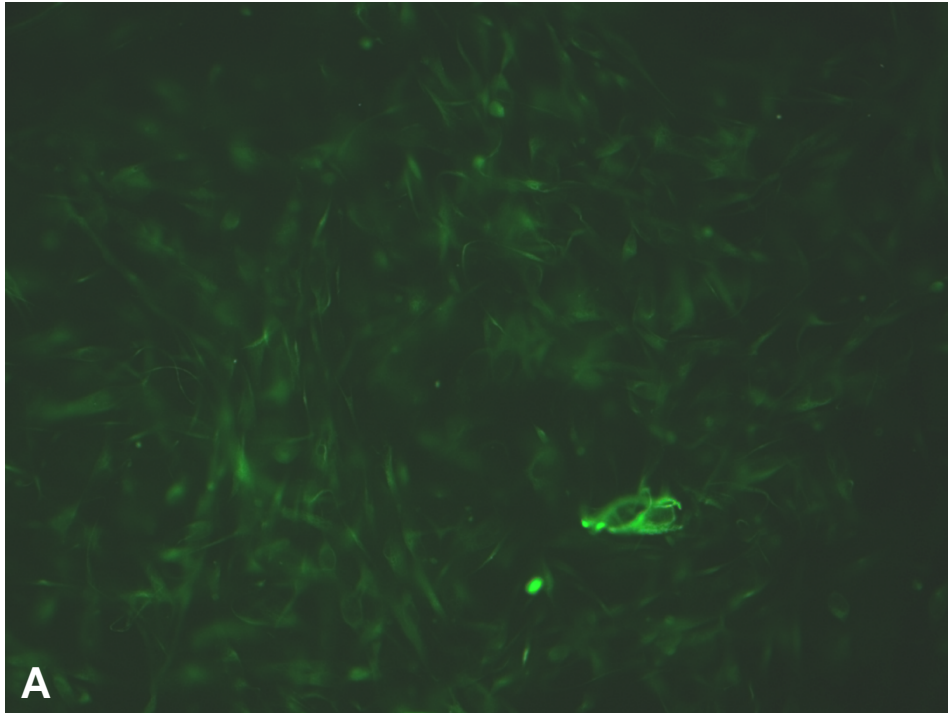
Se llevó a cabo un recuento de las células S-100 positivas frente a las S-100 negativas para determinar el porcentaje de SCs. Para ello, se contaron las células S-100 positivas y los núcleos, teñidos con DAPI, en cuatro campos y se hizo la media calculando el porcentaje de SCs con respecto a la cantidad de células totales. Se contaron las células S-100 positivas y los núcleos de las placas con células procedentes de los nervios de las cuatro últimas ratas (Tabla I).

**Tabla I. Porcentaje de células S-100 positivas.**

<b>Experimento</b>	<b>S-100 positivas</b>	<b>DAPI</b>	<b>Porcentaje S-100 positivas</b>
<b>3º experimento</b>	8,25	64,25	12,8405
<b>4º experimento</b>	16,75	82,75	20,2417
<b>5º experimento</b>	28,25	51,75	54,5894
<b>6º experimento</b>	97	167	58,0838
<b>MEDIA TOTAL</b>	<b>37,5625</b>	<b>91,4375</b>	<b>41,0800</b>

En la tabla se puede ver el porcentaje de células S-100 positivas, es decir, de células de Schwann. El anticuerpo anti S-100 solo tiñe las SCs mientras que el DAPI tiñe el núcleo de todas las células. En el tercer experimento, las células llevaban 61 días en cultivo; en el cuarto, 49 días; en el quinto, 40 días y en el sexto, 21 días.

Al hacer la media entre los resultados obtenidos de los cuatro experimentos, se tiene que el porcentaje de SCs es del  $41,08\% \pm 23,22$ . Los datos de la Tabla I muestran que el porcentaje de SCs disminuye a medida que aumenta el número de días que las células permanecen en cultivo (Fig. 7).



**Figura 7. Células S-100 positivas obtenidas a partir del nervio ciático extraído de la tercera rata. (A) Tras 14 días de cultivo (x20). (B) Tras 61 días en cultivo (x40). En la imagen A la cantidad de SCs es mucho mayor que la obtenida antes de realizar el último pase (imagen B).**

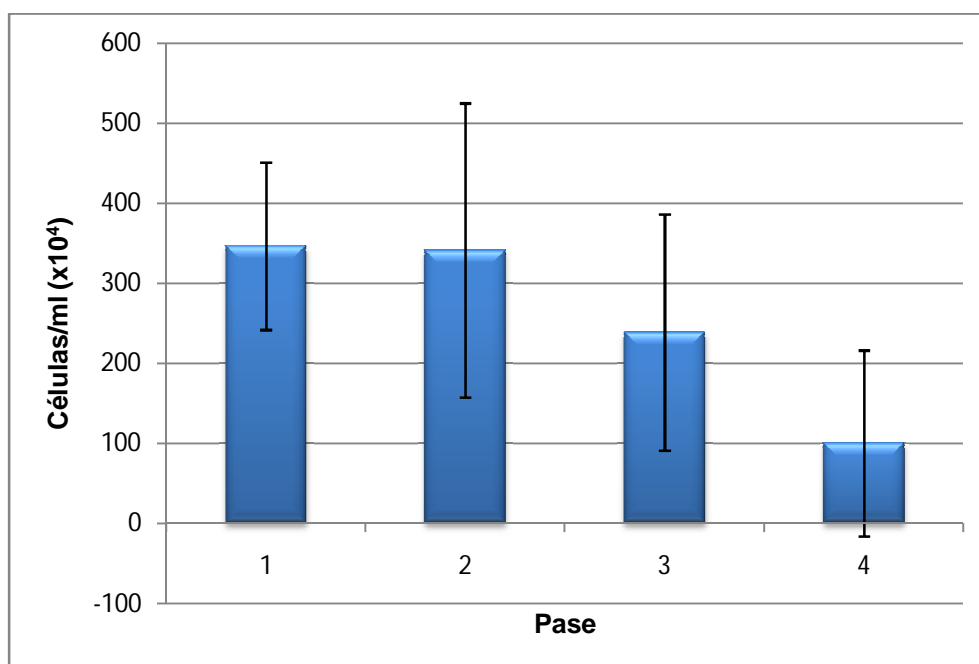
### Cuantificación de las SCs

Cuando se alcanzaba una confluencia de aproximadamente el 80%, se realizaba el subcultivo de las células, desprendiéndolas y realizando posteriormente el recuento celular mediante una cámara de Neubauer.

Las células por mililitro que se obtuvieron en cada pase a partir de los nervios ciáticos de las ratas se muestran en la Tabla II.

**Tabla II. Células/ml en cada pase.**

Experimento	E1	E3	E4	E5	E6	Media
Pase	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )
1	360	520	260	318	274	346,4
2	200	660	324	260	262	341,2
3	200	454	42	236	260	238,4
4	260	112	-	16	12	100



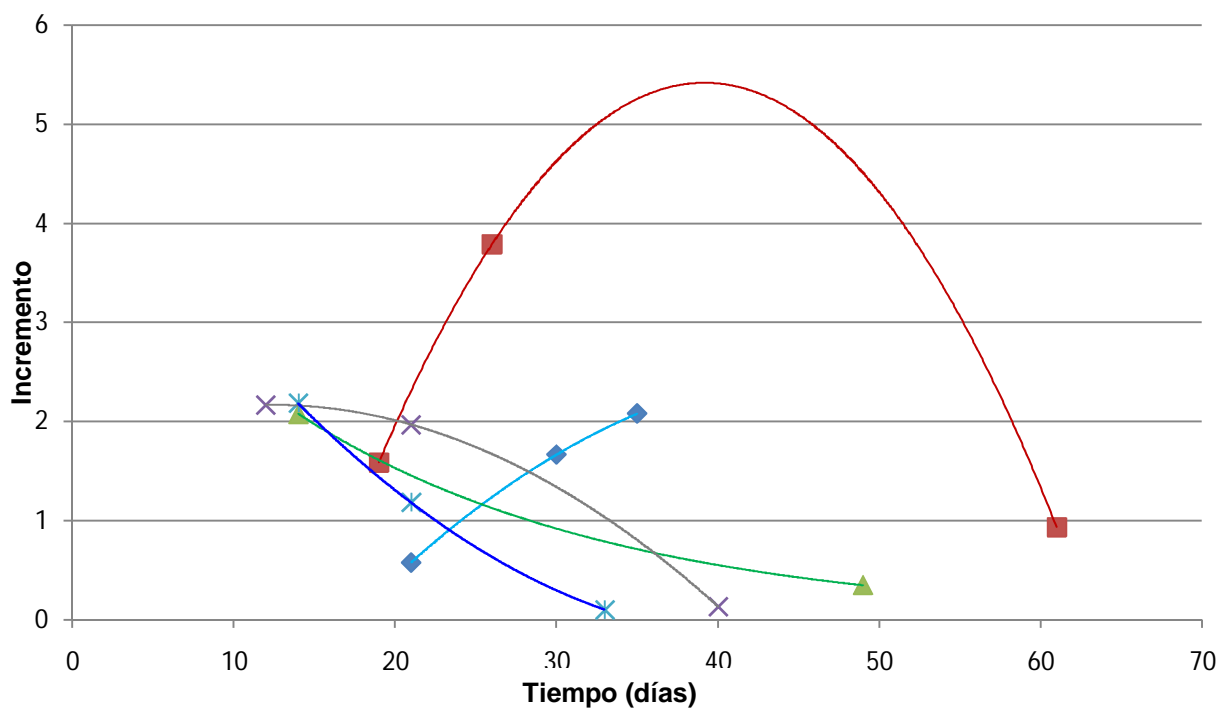
**Figura 8. Media de células/ml de los cinco experimentos obtenidas en los distintos pases.**

En los dos primeros pases se obtienen las mayores cantidades de células. En el segundo pase las células llevan en cultivo entre 15 y 20 días aproximadamente. Por tanto, a partir de un determinado tiempo en cultivo, el número de células va disminuyendo (Tabla I, Tabla II, Fig. 8).

También se examinó el incremento que se obtenía en función de las células sembradas y las células obtenidas con respecto al tiempo (Fig. 9).

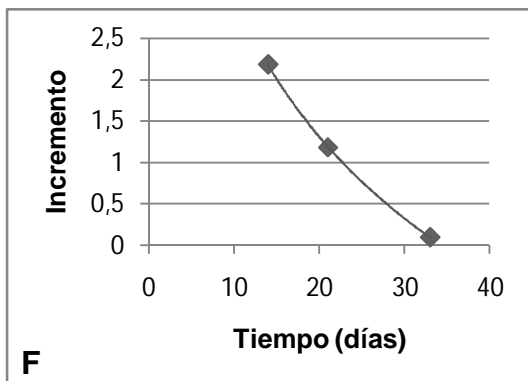
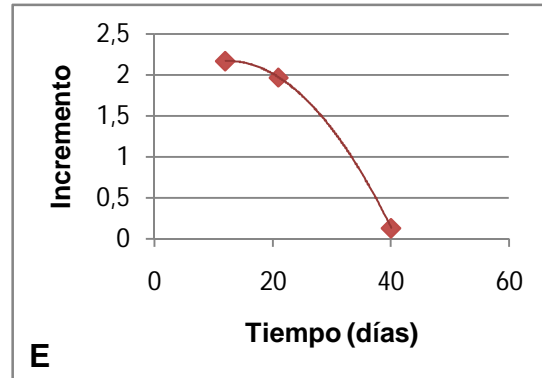
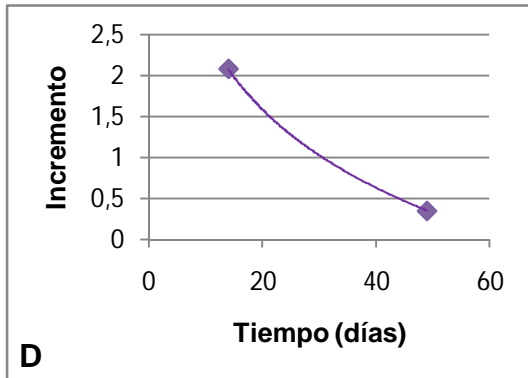
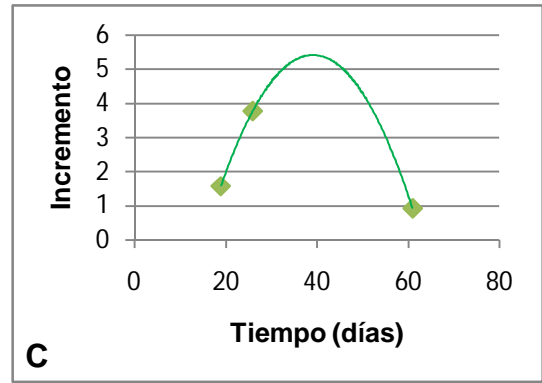
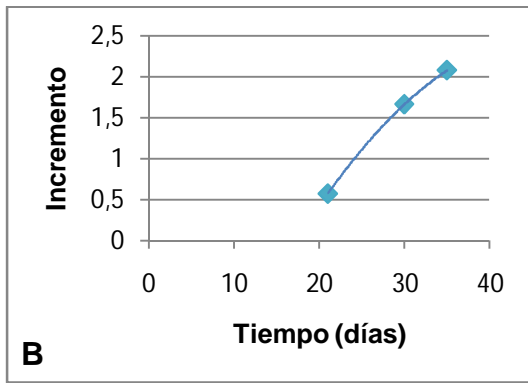
**Tabla III. Datos de los distintos experimentos.**

Experimento	Tiempo (días)	Células obtenidas ( $\times 10^4$ )	Células sembradas ( $\times 10^4$ )	Incremento
#1	21	200	345,6	0,5787
	30	200	120	1,6667
	35	260	125	2,08
#3	19	660	416	1,5865
	26	454	120	3,7833
	61	112	120	0,9333
#4	14	324	156	2,0769
	49	42	120	0,35
#5	12	260	120	2,1667
	21	236	120	1,9667
	40	16	120	0,1333
#6	14	262	120	2,1833
	21	260	220	1,1818
	33	12	120	0,1



**A**





**Figura 9. Incremento (células obtenidas/células sembradas) en función del tiempo en días.** (A) Evolución de los cinco experimentos (azul claro: primer experimento; rojo: tercer experimento; verde: cuarto experimento; gris: quinto experimento; azul oscuro: sexto experimento). (B) Primer experimento. (C) Tercer experimento. (D) Cuarto experimento. (E) Quinto experimento. (F) Sexto experimento.

# DISCUSIÓN

---

Se ha establecido que las SCs son necesarias para la regeneración en el sistema nervioso periférico, al menos en parte, debido a la expresión de factores neurotróficos, moléculas de adhesión y moléculas de la matriz extracelular. Estas propiedades también deberían dar soporte a la regeneración en el sistema nervioso central. Por todo esto, uno de los tratamientos propuestos para la reparación de lesiones nerviosas y daños en la médula espinal son los trasplantes autólogos de SCs. Sin embargo, se ha visto que las SCs por sí solas no conducen a la recuperación esperada y posiblemente tengan que ser combinadas con tratamientos adicionales (Bunge and Wood, 2012). A pesar de esto, para poder llevar a cabo estos tratamientos, es fundamental disponer de métodos que permitan obtener grandes cantidades de SCs en tiempos relativamente cortos y con una pureza adecuada, siendo uno de los principales obstáculos la contaminación por fibroblastos.

En este trabajo se trató de poner a punto el cultivo de SCs mediante predegeneración *in vitro* utilizando el mitógeno NRG1- $\beta$ 1. La degeneración nerviosa anterógrada, también conocida como degeneración walleriana, es un proceso que tiene lugar en la porción distal a la lesión de un axón. Esto hace que los axones, desconectados del soma, se fragmenten y que los macrófagos y fibroblastos se infiltren en el nervio predegenerado. Muchos estudios han mostrado que estas células proporcionan soporte a las SCs, promoviendo su proliferación por la producción de sus factores mitogénicos e induciendo la expresión del factor de crecimiento neural (NGF) por la secreción de interleucina-1 (Hedayatpour et al., 2007). Se ha confirmado que el número de SCs que se obtiene tras la predegeneración del nervio (*in vitro* o *in vivo*) es mayor que el que se obtiene sin predegeneración previa (Mauritz et al., 2004; Niapour et al., 2010). En este trabajo, al igual que en otros estudios (de la Fuente et al., 2012), se realizó la predegeneración *in vitro* con los fragmentos de nervios flotando en un medio de cultivo, ya que en esta situación parece ser que los fibroblastos permanecen quiescentes mientras las SCs responden a los mitógenos. Esta situación es similar a la que se da cuando los fibroblastos se cultivan en matrices de colágeno flotantes, hay un descenso en la señalización a través de la vía ERK (Rosenfeldt and Grinnell, 2000), una inhibición de la regulación de la ciclina D1 (Fringer and Grinnell, 2001), lo cual puede conducir a la degeneración de los fibroblastos en lugar de a su proliferación. Los nervios permanecieron en predegeneración durante 7 días, ya que en estudios previos se había determinado que este es el tiempo óptimo para que tenga lugar este proceso (Keilhoff et al., 1999).

El medio utilizado para el cultivo de las SCs fue DMEM con una concentración de FBS del 10%. Estudios previos han establecido que es necesario un 10% de FBS para facilitar el establecimiento de los cultivos de SCs y que con esta concentración se favorece la migración de SCs desde los fragmentos de nervios (Hedayatpour et al., 2007; de la Fuente et al., 2012). En otros estudios se han probado distintas concentraciones de FBS y se ha determinado que es adecuado variar el porcentaje de suero a medida que avanza el cultivo ya que con un 2,5% se tiene una mayor proliferación de SCs y se suprime la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, Mauritz et al. (2004) establecieron que el medio óptimo para el cultivo de las SCs era un medio

de crecimiento de melanocitos con forskolina, FGF-2 y extracto de pituitaria bovina, es decir, un medio sin suero. Al no tener suero, es necesario añadir factores como la forskolina, pero se ha visto que esta puede dar lugar a determinados efectos adversos en una posible aplicación clínica en humanos (Hedayatpour et al., 2007; de la Fuente et al., 2012). Por esto, en este estudio se utiliza medio con FBS que reemplaza el efecto de la forskolina y permite la acción del mitógeno utilizado, la neuregulina (de la Fuente et al., 2012).

Uno de los principales problemas, como ya se ha comentado, es la contaminación por fibroblastos. Por esto, se confirmó la importancia de retirar el epineuro de los nervios antes de cultivar los nervios tras su extracción, ya que, los nervios obtenidos de las dos primeras ratas se cultivaron con el epineuro y la contaminación por fibroblastos fue mucho mayor que en los nervios del resto de las ratas a los que sí se les retiró el epineuro. En el primer experimento, al observar las células al microscopio de contraste de fases, se vio que las células presentaban con el paso del tiempo una morfología característica de fibroblastos, es decir, una forma más plana y polimórfica con un núcleo redondeado y grandes citoplasmas. Los fibroblastos tienen tasa de proliferación más altas que las SCs y es por esto por lo que posiblemente la gráfica que representa los datos de la primera rata (Fig. 9A, 9B) es distinta al resto de las gráficas, ya que se ve que con el paso del tiempo el incremento aumenta en lugar de disminuir. También se pudo comprobar el importante papel de la NRG1- $\beta$ 1 en la proliferación, supervivencia y diferenciación de las SCs. Los nervios extraídos de la segunda rata se subcultivaron en DMEM pero no se adicionó la NRG1- $\beta$ 1 y las células que se observaron al microscopio no mostraban la morfología típica de las SCs, sino que eran células planas de mayor tamaño, es decir, células con características de fibroblastos (datos no mostrados).

Los métodos inmunológicos son efectivos y permiten diferenciar los distintos tipos celulares que se tienen en el cultivo. Aunque las SCs se caracterizan por su morfología ahusada bipolar o, en algún caso, tripolar, de núcleo denso y alargado, en ocasiones, pueden presentar una morfología más aplanada y esto puede hacer que se confundan con fibroblastos. Por esto, el análisis inmunohistoquímico permite identificar estas células de forma no ambigua. Las SCs, a diferencia de los fibroblastos, expresan el antígeno neuroectodermal S-100, por tanto, se utilizó un anticuerpo anti- S-100 marcado con fluoresceína. Esta técnica permitió, por un lado, confirmar que se tenían SCs, ya que las células S-100 positivas presentaban la morfología típica y las características propias de las SCs como la tendencia a alinearse unas detrás de otras formando filas. Por otro lado, se pudo determinar que la cantidad de SCs es mayor en los primeros pases y que va disminuyendo a partir de un determinado tiempo en cultivo, ya que, por ejemplo, tras 61 días en cultivo el porcentaje de células S-100 positivas fue del 12,84% mientras que tras 21 días, el porcentaje fue del 54,08%. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, ya que se confirma que el mayor número de células se obtiene tras 15-21 días en cultivo (Komiya et al., 2003; Hedayatpour et al., 2007). Otros autores determinaron que para obtener mayores cantidades de SCs es necesario llevar a cabo un segundo enriquecimiento mediante, por ejemplo, el procedimiento Cold Jet (Mauritz et al., 2012). En este trabajo no se realizó un segundo enriquecimiento.

Se observó que el mayor número de células se obtuvo en los dos primeros pases (Fig. 8) con una media de entre  $341 \times 10^4$  -  $346 \times 10^4$  células/ml. Esto se corresponde con tiempos de cultivo de entre 14 y 21 días aproximadamente, por lo que estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios en los que se alcanzaba el máximo número de células en un periodo de tiempo similar (Hedayatpour et al., 2007; de la Fuente et al., 2012). A partir de entonces, el número de células iba disminuyendo (Fig. 9).

# CONCLUSIONES

---

1ª) El mayor número de células se obtenía en los dos primeros pases, es decir, entre 14 y 21 días aproximadamente, con una media de  $3,43 \times 10^6$  células/ml. En el tercer pase, el número de células era de una media de  $2 \times 10^6$  células/ml y en el último pase, 1 millón de células/ml. El crecimiento del cultivo se estabilizó en la tercera semana, a partir de la cual la proliferación celular comenzaba a disminuir progresivamente.

2ª) La pureza del cultivo fue del 58,08% a los 21 días y descendió al 12,84% a los 61 días.

3ª) La NRG1- $\beta$ 1 se mostró como un factor mitogénico efectivo para las SCs en cultivo frente al crecimiento de los fibroblastos.

4ª) Este método basado en una predegeneración *in vitro* durante siete días y el uso de la NRG1- $\beta$ 1 podría ser un procedimiento seguro y eficaz a la hora de obtener cultivos con altas purzas y cantidades de SCs en un periodo de tiempo corto, lo que haría posible su aplicación en la clínica.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Beirowski, B. Concepts for regulation of axon integrity by enwrapping glia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 256 (2013).
2. Bertelli, J. A., Taleb, M., Mira, J. C. & Ghizoni, M. F. Functional recovery improvement is related to aberrant reinnervation trimming. A comparative study using fresh or predegenerated nerve grafts. *Acta Neuropathol.* 111, 601-609 (2006).
3. Brockes, J. P., Fields, K. L. & Raff, M. C. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res.* 165, 105-118 (1979).
4. Bunge, M. B. & Wood, P. M. Realizing the maximum potential of Schwann cells to promote recovery from spinal cord injury. *Handb. Clin. Neurol.* 109, 523-540 (2012).
5. Calderon-Martinez, D., Garavito, Z., Spinel, C. & Hurtado, H. Schwann cell-enriched cultures from adult human peripheral nerve: a technique combining short enzymatic dissociation and treatment with cytosine arabinoside (Ara-C). *J. Neurosci. Methods* 114, 1-8 (2002).
6. Carrel, A. & Burrows, M. T. Cultivation in Vitro of the Thyroid Gland. *J. Exp. Med.* 13, 416-421 (1911).
7. Carrel, A. & Burrows, M. T. Cultivation of Tissues in Vitro and its Technique. *J. Exp. Med.* 13, 387-396 (1911).
8. Carrel, A. & Burrows, M. T. An Addition to the Technique of the Cultivation of Tissues in Vitro. *J. Exp. Med.* 14, 244-247 (1911).
9. Carrel, A. Pure culture of cells. *J. Exp. Med.* 16, 2, 165-168, United States (1912).
10. Danielsen, N. *et al.* Pre-degenerated nerve grafts enhance regeneration by shortening the initial delay period. *Brain Res.* 666, 250-254 (1994).
11. De Felipe, J. & Jones, E. G. Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system. *History of Neuroscience* 5, 379-382, United States (1991).
12. De la Fuente, I., Alcalde, I., Gamboa, O. L., Garrosa, M. & Gayoso, M. J. A method for obtaining Schwann cell cultures from adult rabbit nerve based on "in vitro" pre-degeneration and neuregulin treatment. *Histol. Histopathol.* 27, 95-102 (2012).
13. Fields, K. L. & McMenamin, P. Schwann cells cultured from adult rats contain a cytoskeletal protein related to astrocyte filaments. *Brain Res.* 352, 259-269 (1985).
14. Fricker, F. R. & Bennett, D. L. The role of neuregulin-1 in the response to nerve injury. *Future Neurol.* 6, 809-822 (2011).
15. Fringer, J. & Grinnell, F. Fibroblast quiescence in floating or released collagen matrices: contribution of the ERK signaling pathway and actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* 276, 31047-31052 (2001).

16. Haastert, K., Seef, P., Stein, V. M., Tipold, A. & Grothe, C. A new cell culture protocol for enrichment and genetic modification of adult canine Schwann cells suitable for peripheral nerve tissue engineering. *Res. Vet. Sci.* 87, 140-142 (2009).
17. Hedayatpour, A. *et al.* A method for isolation and cultivation of adult Schwann cells for nerve conduit. *Arch. Iran. Med.* 10, 474-480 (2007).
18. Keilhoff, G., Goihl, A., Stang, F., Wolf, G. & Fansa, H. Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 12, 1451-1465 (2006).
19. Komiyama, T. *et al.* A novel technique to isolate adult Schwann cells for an artificial nerve conduit. *J. Neurosci. Methods* 122, 195-200 (2003).
20. Kreider, B. Q. *et al.* Enrichment of Schwann cell cultures from neonatal rat sciatic nerve by differential adhesion. *Brain Res.* 207, 433-444 (1981).
21. 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* 123, 167-173 (2003).
22. 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. *J. Neurosci. Res.* 77, 453-461 (2004).
23. Morrissey, T. K., Kleitman, N. & Bunge, R. P. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J. Neurosci.* 11, 2433-2442 (1991).
24. Niapour, A. *et al.* Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells. *Biotechnol. Lett.* 32, 781-786 (2010).
25. Pleasure, D. *et al.* Schwann-like cells cultured from human dermal neurofibromas. Immunohistological identification and response to Schwann cell mitogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 486, 227-240 (1986).
26. Rosenfeldt, H. & Grinnell, F. Fibroblast quiescence and the disruption of ERK signaling in mechanically unloaded collagen matrices. *J. Biol. Chem.* 275, 3088-3092 (2000).
27. Salzer, J. L. Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 17 Suppl 3, 14-19 (2012).
28. Samara, C., Poirot, O., Domenech-Estevéz, E. & Chrast, R. Neuronal activity in the hub of extrasynaptic Schwann cell-axon interactions. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 228 (2013).
29. Scarpini, E., Kreider, B. Q., Lisak, R. P. & Pleasure, D. E. Establishment of Schwann cell cultures from adult rat peripheral nerves. *Exp. Neurol.* 102, 167-176 (1988).
30. Woodhoo, A. & Sommer, L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia* 56, 1481-1490 (2008).

