



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LIMITE DE VARIACION EN LA DISTRIBUCION DE
LAS FIBRAS MIELINICAS Y AMIELINICAS DEL
NERVIO SURAL NORMAL HUMANO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A ,
GUADALUPE VARGAS SOTO



D I R I G I D A
DRA. FERNANDA
DR. GABRIEL

P O R :
TEIXEIRA
CORKIDI

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

178
Res.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

LIMITE DE VARIACION EN LA DISTRIBUCION DE LAS FIBRAS MIELINICAS
Y AMIELINICAS DEL NERVIO SURAL NORMAL HUMANO.

realizado por GUADALUPE VARGAS SOTO

con número de cuenta 8013664-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. FERNANDA TEIXEIRA

F. Teixeira

Propietario

DR. GABRIEL CORKIDI BLANCO

G. Corkidi

Propietario

M. en C. PATRICIA RIVAS MANZANO

Patricia Rivas

Suplente

DRA. MARICELA VILLAGRAN SANTA CRUZ

Maricela Villagran

Suplente

M. en C. LETICIA PARRA GÁMEZ

Leticia Parra

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTÍNEZ MENA

[Firma]
COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGIA

**A MIS PADRES Y HERMANOS ... POR LO MUCHO QUE
SIGNIFICAN PARA MI .**

A MI PEQUEÑO HIJO ... POR SU GRAN CARINO

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Fernanda Teixeira, al Dr. Gabriel Corkidi y a la Dra. Silvia Ruiz por su tiempo dedicado a la enseñanza y realización del presente trabajo.

A la M. en C. Patricia Rivas, a la Dra. Maricela Villagran y a la M. en C. Leticia Parra, revisores de tesis, por la dedicación y sugerencias al presente trabajo.

A Jorge Márquez del Laboratorio de Imágenes del Centro de Instrumentos, UNAM, y al personal del Laboratorio de Neuropatología Experimental del INNN; Alma Ortiz y Viktor Romero por su valiosa ayuda.

A Veronica Reyes y Carina Hernández por su colaboración.

Al Dr. Mariano Ramírez por su apoyo y filosofía.

A todos mis maestros y demás personas que han escrito algo de mi historia.

INFINITAMENTE GRACIAS .

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuropatología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía **MANUEL VELASCO SUAREZ** bajo la dirección de la Dra. Fernanda Teixeira, con la co-dirección del Dr, Gabriel Corkidi del Laboratorio de Imágenes del Centro de Instrumentos de la UNAM y la colaboración de la Dra. Silvia Ruíz Velasco del Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas, UNAM.

I N D I C E

Resumen	1
Introducción al Sistema Nervioso	3
Desarrollo del Sistema Nervioso Humano	3
Histología del Sistema Nervioso Humano	8
Fisiología del Sistema Nervioso Humano	14
Antecedentes	17
Objetivos	21
Materiales y Métodos	22
Cuantificación de las fibras mielínicas	25
Cuantificación de las fibras amielínicas	26
Resultados	29
Discusión	39
Conclusiones	44
Bibliografía	45

RESUMEN

Los nervios periféricos están constituidos por fibras mielínicas y amielínicas, células de Schwann, fibroblastos, escasas células cebadas y algún macrófago. Cada nervio está formado por fascículos y tejido conectivo dispuesto en capas. La capa más externa es el epineuro que rodea a todo el nervio. Alrededor de cada fascículo se encuentra el perineuro y dentro del fascículo se localiza el endoneuro.

Las fibras nerviosas periféricas presentan una gama limitada de reacciones a la agresión. Los tipos principales de lesión consisten en la degeneración axónica y en la desmielinización segmentaria, eventos que ocurren en numerosas neuropatías (Rubin y Farber, 1990).

Para determinar el tipo y grado de neuropatía periférica se requiere una biopsia del nervio, una evaluación cualitativa y cuantitativa de sus fibras y datos morfométricos normales de acuerdo a la edad como punto de comparación.

En estudios anteriores se han realizado histogramas de los diámetros axonales de pacientes aislados, sin embargo los valores propuestos varían en cierto grado de un autor a otro. En el presente trabajo se elaboraron histogramas y distribuciones con sus límites de normalidad o variabilidad de los diámetros axonales del nervio sural normal humano, estableciendo la variación de sus fibras conforme a la edad, de tal forma que se cuente con un patrón de referencia en

la determinación cuantitativa de neuropatía periférica.

Se recomienda el sistema de procesamiento digital de imágenes para la cuantificación de las fibras nerviosas en las biopsias de nervios periféricos.

Los límites de normalidad descritos son útiles para la evaluación morfométrica de las biopsias del nervio safeno externo.

INTRODUCCION

El tejido nervioso esta distribuido por todo el organismo y anatomicamente se divide en dos partes: sistema nervioso central y sistema nervioso periférico.

El sistema nervioso central esta constituido por el encéfalo y la médula espinal; el sistema nervioso periférico involucra nervios y ganglios nerviosos (Murray y Kiernan, 1986).

DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO HUMANO

El sistema nervioso humano se desarrolla del ectodermo dorsal de los embriones recién formados. A los 16 días de desarrollo embrionario se forma el neuroepitelio situado en la línea media del embrión, constituyendo la placa neural. Dos días más tarde esta placa sufre una depresión paulatina que da lugar al surco neural. Al final de la tercera semana el surco neural empieza a fusionarse en dirección rostro-caudal hasta constituir el tubo neural y hacia el día vigésimo cuarto y vigésimo sexto se cierran sus extremos rostral y caudal respectivamente. En la porción rostral del tubo neural se da un crecimiento y diferenciación elevados para dar lugar a una porción grande y compleja: el encéfalo. El resto del tubo neural formará la médula espinal.

Las células del neuroepitelio que no se incorporan al tubo neural forman las crestas neurales que se sitúan dorso-

lateralmente a este, y de las cuales derivan los ganglios de la raíz dorsal de los nervios espinales (fig.1)(Tatárinov , 1980).

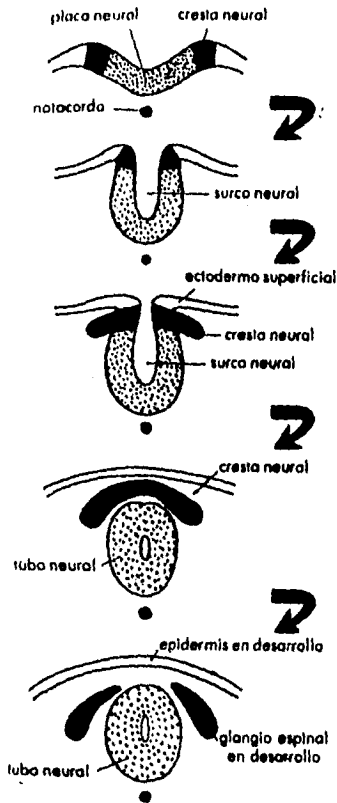


Fig.1. Desarrollo ontogénico del tubo neural. Secciones transversales de embriones humanos de diferentes edades en donde se ilustra la formación del surco, el tubo y crestas neurales hasta el fin de la cuarta semana (tomado de Moore, 1988).

De las células hijas que se generan en el neuroepitelio derivan los neuroblastos, células que han perdido su capacidad de dividirse mitóticamente. Al principio son bipolares, pero posteriormente sufren retracción de una de sus prolongaciones quedando como unipolares. Al poco tiempo los neuroblastos unipolares emiten varias prolongaciones citoplásmicas para dar lugar a neuroblastos multipolares, que más tarde establecerán conexiones con otras células en diferentes partes del sistema nervioso. Tras el primer oleaje en la formación de neuroblastos, otras células neuroepiteliales siguen el curso de diferenciación que las conduce a la formación de células precursoras de la neuroglia y que posteriormente originan a las células astrocíticas, oligodendrogiales y ependimarias pertenecientes al sistema nervioso central y también a las células de Schwann y a las células satélites de los ganglios, en el sistema nervioso periférico (fig. 2) (Carlson, 1990; Beresford, 1975).

Por la quinta semana de desarrollo intrauterino, se diferencian neuronas sensitivas en los ganglios de los nervios espinales, que emiten una prolongación aferente (dendrita) hacia la periferia y otra prolongación eferente (axón) que penetra en el esbozo del asta posterior o dorsal de la recién formada médula espinal o neuroeje. El conjunto de estas fibras aferentes constituye la raíz sensitiva del nervio raquí-

deo y a la salida de la médula espinal, el elemento sensitivo del nervio. Las células agrupadas en el esbozo del asta ventral o anterior del neuroeje se diferencian en neuronas motoras y sus axones reunidos emergen de la médula espinal para constituir la raíz motora del nervio raquídeo. La raíz motora se une con la raíz sensitiva al salir de la médula espinal (fig. 3)(Moore, 1988).

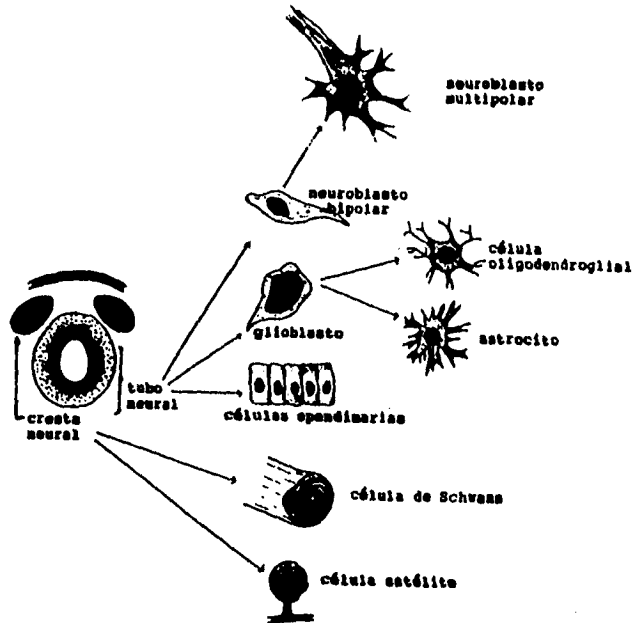


Fig. 2. Diagrama que ilustra las principales líneas de diferenciación celular a partir del neuroepitelio.(tomado de Carlson, 1990).

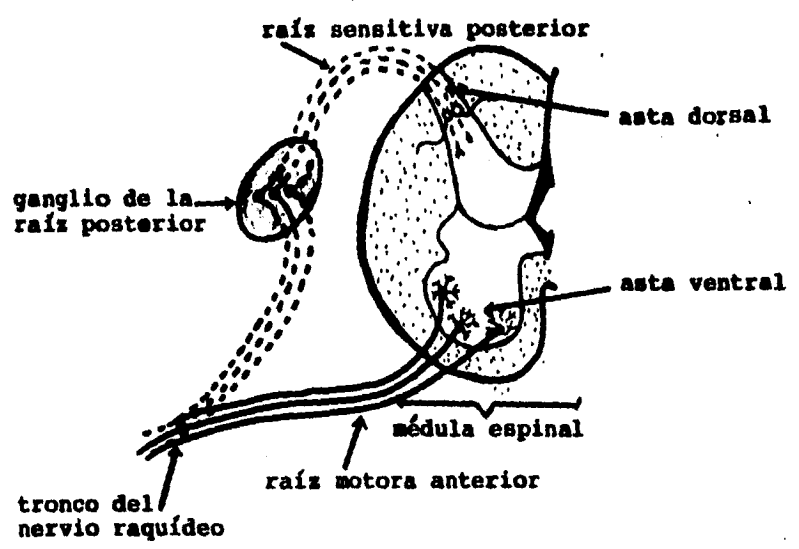


Fig. 3. Esquema que muestra los cilindroejes motores y sensitivos de las raíces motora y sensitiva respectivamente, así como el asta dorsal y ventral, el ganglio de la raíz dorsal y el tronco del nervio raquídeo donde se unen la raíz motora y sensitiva (tomado de Sadler, 1990).

HISTOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso central humano (encéfalo y médula espinal) se compone de sustancia gris y sustancia blanca. La sustancia gris esta formada por los cuerpos neuronales que se encuentran inmersos en una red de prolongaciones nerviosas y neurogliales, llamada neurópilo. La sustancia blanca contiene prolongaciones nerviosas y células neurogliales.

El sistema nervioso periférico involucra nervios y ganglios, y es a través de los nervios que el sistema nervioso central esta unido a todos los órganos y tejidos del cuerpo. Los ganglios son concentraciones de neuronas que se encuentran fuera del encéfalo y médula espinal. Los nervios son estructuras constituidas por grupos o fascículos de fibras nerviosas (axones) cubiertas por tejido conectivo (Beresford, 1975). La capa más externa de tejido conectivo que rodea al nervio se llama epineuro, contiene fibroblastos, fibras colágenas orientadas longitudinalmente, vasos sanguíneos y linfáticos y algunas células adiposas. Cada uno de los fascículos del nervio está envuelto por capas concéntricas de células especiales que forman el perineuro y dentro del fascículo se encuentra el espacio endoneural, que contiene escasos fibroblastos esparcidos entre las fibras nerviosas, células de Schwann, fibras colágenas y material granular amorfo o finamente fibrilar (fig. 4)(Asbury y Johnson, 1978; Fawcett, 1991).

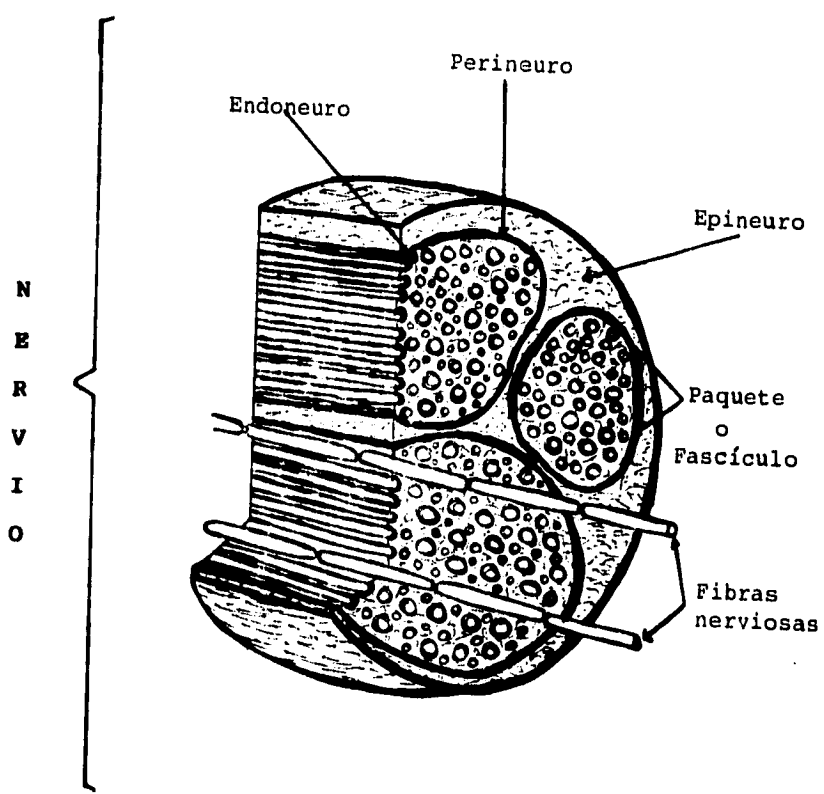


Fig. 4. Representación esquemática de un nervio en corte transversal, mostrando la disposición de las capas de tejido conectivo: epineuro, perineuro y endoneuro (tomado de Cormack, 1988).

Las fibras nerviosas o axones son de dos tipos: mielínicos y amielínicos. En el sistema nervioso periférico ambos tipos de fibras están envueltas por la membrana plasmática de las células de Schwann, que rodean al axón desde su salida del sistema nervioso central hasta casi sus terminaciones periféricas. En el sistema nervioso central los axones son rodeados por los oligodendrocitos y en los ganglios periféricos por las células satélite (fig.5)(Murray y Kiernan, 1986).



Fig. 5. Micrografía electrónica de una porción fascicular del nervio sural, mostrando fibras mielínicas (flecha grande) y amielínicas (flecha pequeña), rodeadas por la membrana plasmática de la célula de Schwann. Donde N indica el núcleo de la célula de Schwann (16000 X).

En el nervio safeno externo o sural los axones mielínicos presentan un diámetro externo que varía entre 1-18 μm y mantienen una relación directa entre el calibre del axón y el grosor o número de capas de mielina. La mielina es una envoltura especializada que se forma por enrollamiento de la membrana plasmática de la célula de Schwann alrededor del axón (fig.6). A este proceso se le llama mielinización (Asbury y Johnson, 1978).

Las células de Schwann son indispensables para la vida y función de las fibras nerviosas periféricas, ya que tienen a su cargo el proceso de mielinización y remielinización en el sistema nervioso periférico durante la vida normal del individuo. Estas células también desempeñan un papel importante en la regeneración axonal en casos de lesiones mecánicas o por enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico (Bradley y Asbury, 1970; Thomas, 1970; Ochoa, 1978).

En el caso de los axones mielínicos periféricos, una célula de Schwann mieliniza sólo un corto segmento del axón, quedando un pequeño espacio entre una célula de Schwann y la siguiente, por lo que la vaina de mielina se verá interrumpida a intervalos regulares en los puntos donde termina una célula de Schwann y empieza la otra a lo largo del axón. Dichos puntos son llamados nodos de Ranvier. A cada segmento

mielinizado se le llama internodo y presenta fisuras oblicuas o áreas de separación local de las láminas de mielina. A tales fisuras se les denomina escisuras de Schmidt-Lanterman (fig.7)(Fawcett, 1991).



Fig. 6. Micrografía electrónica de la célula de Schwann (flecha grande) envolviendo una fibra miélnica (flecha pequeña), N= núcleo de la célula de Schwann (25000 X).

Las células de Schwann también envuelven a los axones amielínicos y pueden incluir hasta una docena de ellos (fig. 5). Aunque en este caso no forman una vaina de mielina, sí proporcionan sostén y protección. El diámetro de las fibras amielínicas en el nervio sural se encuentra en el intervalo de 0.2 a 2 μm y su proporción es de 2-4 fibras amielínicas por cada fibra mielinica (Asbury y Johnson, 1978).

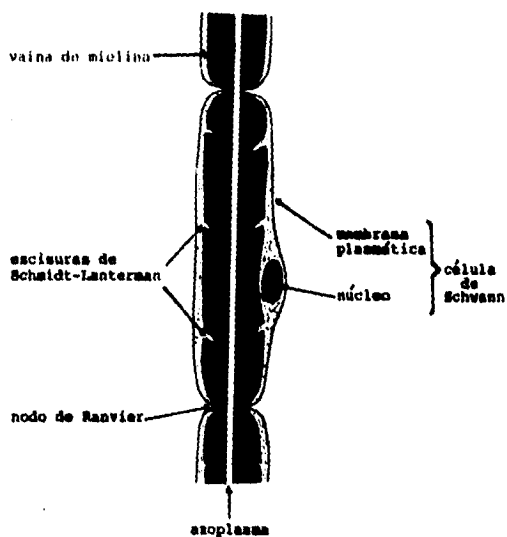


Fig. 7. Esquema de una sección longitudinal de una fibra mielinica, mostrando el Nodo de Ranvier y las escisuras de Schmidt-Lanterman (Tomado de Murray y Kiernan, 1986).

FISIOLOGIA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO

La función de recepción, integración y respuesta del tejido nervioso depende de la generación y distribución de los impulsos nerviosos y de la producción y liberación de neurotransmisores (Junqueira y Carneiro, 1990).

La propagación de los impulsos nerviosos a través de los axones se da con la perturbación momentánea del potencial de reposo de la membrana plasmática o axolema. Este potencial de reposo se mantiene por medio de la bomba sodio-potasio, la cual impulsa el sodio hacia el exterior en contra de su gradiente de concentración y al potasio hacia el interior. Debido a un estímulo eléctrico, químico o mecánico de intensidad suficiente para alterar la permeabilidad de la membrana se genera un potencial del acción. Este se da en dos etapas; la primera de despolarización que ocurre cuando la permeabilidad de la membrana para el sodio aumenta bruscamente permitiendo que el sodio viaje hacia el interior de la fibra como resultado de su gradiente de concentración, aumentando las cargas positivas que provocan la desaparición total del potencial de reposo. Por un periodo breve los canales de sodio se inactivan permitiendo que la despolarización continúe en la región del axolema delante de la onda de despolarización impidiendo que se desplace en sentido retrógrado. Inmediatamente después viene la etapa de repolarización en la que los poros de la membrana vuelven a ser casi imper-

meables al sodio y permeables al potasio reduciéndose las cargas positivas totales del axoplasma y restaurándose así el potencial de reposo en el sitio de despolarización. Este proceso se da a lo largo del axón amielínico a través de su membrana plásmática, afectándola en su totalidad, sin interrupción hasta las terminaciones axonales (Cormack, 1988 ; Guyton, 1972).

El impulso es transmitido en dirección a la terminación axónica o telodendrón donde el flujo de corriente eléctrica generado por el potencial de acción hace que numerosas vesículas (sinápticas) liberen su neurotransmisor hacia el espacio entre el telodendrón y la membrana de la siguiente célula de contacto (neurona, miocito, etc.). El neurotransmisor actúa sobre la membrana de la célula de contacto o postsináptica desencadenando un nuevo potencial de acción. A este tipo de transmisión se le llama sinápsis química y es la más común, aunque existen sinápsis eléctricas en las que las células nerviosas se relacionan por uniones estrechas que permiten el paso de iones de una célula a otra facilitando su conexión eléctrica y la transmisión del impulso (Junqueira y Carneiro, 1990).

En el caso de las fibras mielínicas los impulsos nerviosos son conducidos con una variante ya que se considera que la vaina de mielina es una cubierta aislante que impide el paso de iones, por lo tanto el potencial de acción sólo

puede darse en las áreas desnudas de la fibra, es decir, en los nodos de Ranvier. Este proceso recibe el nombre de conducción saltatoria, ya que las corrientes eléctricas siguen por los líquidos extracelulares vecinos y a través del axoplasma de un nodo a otro. En otras palabras, la despolarización salta intervalos grandes mielinizados, aumentando la velocidad de transmisión nerviosa y ahorrando energía en el transporte de iones al despolarizarse solo los nodos de Ranvier (fig.8) (Guyton, 1972).



Fig. 8. Micrografía electrónica de una fibra miélfínica (fm) del nervio sural en corte longitudinal indicando asas citoplásmicas paranodales (flecha pequeña) y el área de conducción saltatoria o Nodo de Ranvier (flecha grande) (16000 X).

ANTECEDENTES

El sistema nervioso periférico está sujeto a diversas alteraciones. La neuropatía periférica es la más común de estas y consiste en cambios degenerativos progresivos que comienzan en las porciones distales de los nervios con síntomas en las manos y pies. Hay múltiples causas de neuropatía periférica, incluyendo deficiencias nutricionales, toxinas de varias clases y desórdenes metabólicos como la diabetes (Murray y Kiernan, 1986).

En la neuropatía diabética se presentan cuadros clínicos diversos. En el caso de la neuropatía diabética sensitiva ocurre degeneración y/o desmielinización de axones de diversos tamaños, mielínicos o amielínicos. El tipo de sensibilidad alterada se relacionará con el diámetro de las fibras afectadas; si se afectan más las fibras amielínicas podría darse dolor o cambios autonómicos como diarrea, si se afectan las fibras grandes podría darse pérdida de la sensibilidad vibratoria. En la neuropatía diabética proximal motora, hay múltiples micro-infartos de los nervios y atrofia muscular. En la neuropatía diabética de nervios craneales hay pérdida temporal de la función de los nervios por infartos. El más afectado es el par III. (Asbury y Johnson, 1978).

En la evaluación de los cambios degenerativos se usa la biopsia de nervios cutáneos, habitualmente del nervio safeno externo o sural, ya que su localización es constante, es ac-

cesible para estudios neurofisiológicos *in vivo* previo a la biopsia y es fácil de diseccionar sin causar daño que pudiera ser irreparable durante el curso de la vida. El análisis cualitativo y cuantitativo de sus componentes proporciona información acerca de la extensión de la degeneración axonal, de la desmielinización y remielinización segmentaria, de los ciclos de mielinización y remielinización repetidos y de las anomalías de la mielina (Merritt, 1979). Para determinar el tipo y grado de neuropatía periférica se debe contar con valores normales de los componentes del nervio periférico (Asbury y Johnson, 1978). Algunos de los primeros trabajos sobre este tema fueron publicados por Ochoa y Mair (1969a y b), los cuales reportan resultados cualitativos y cuantitativos de las fibras mielínicas, de las fibras amielínicas, de los fibroblastos y de los núcleos de las células de Schwann del nervio sural normal. Años más tarde se reporta un trabajo sobre análisis dimensional entre las células de Schwann y sus fibras amielínicas en el nervio sural humano (Carlsen y Behse, 1980). Posteriormente, Origuachi (1981), con un análisis cuantitativo de los componentes del nervio sural de infantes, caracteriza el comportamiento de las fibras nerviosas antes del nacimiento y durante los primeros años de vida. Jacobs y Love (1985), en la investigación de 17 nervios surales de cadáveres de diferentes edades, evaluaron los parámetros de área fascicular,

longitud internodal, diámetro de las fibras y densidad de axones mielínicos y amielínicos. Encontraron que la relación bimodal que existe entre el diámetro axonal y su frecuencia aparece después del primer año de vida y se mantiene hasta edad muy avanzada. Shield y col.(1986) determinan la densidad de las fibras amielínicas a través del desarrollo embrionario en el nervio sural normal de fetos humanos. Ouvrier y col.(1987) hacen un estudio morfométrico sobre el valor normal del área fascicular transversal, la densidad, la distribución y el calibre de las fibras mielínicas, así como también para la fibras amielínicas (1981) de infantes, encontrando que hay una gran densidad de fibras antes del nacimiento y que posteriormente degenera una gran parte de ellas. Otros estudios experimentales se han realizado en animales de laboratorio para estudiar los cambios morfológicos y fisiológicos durante el desarrollo del nervio periférico en embriones de rata (Ziskind-Conhaim,1988). Schafer y Friede(1988) usan nervios periféricos y autónomos de rata para determinar el número de fibras mielínicas en 7 grupos de diferente edad. En 1990 se suma a los anteriores otro estudio morfométrico, sobre los constituyentes del nervio sural humano (Behse,1990), en el que hace hincapie sobre la utilización de métodos computarizados que sean aplicados al diagnóstico clínico, con la tendencia de agilizar los estudios comparativos que anteriormente requerían de mayor tiempo y personal.

De los reportes mencionados se ha recopilado la información referente al número de fibras por mm^2 y a la distribución de los diámetros axonales de nervios normales de sujetos de diferente edad. Los valores encontrados varían de un autor a otro. En ningún caso se considera la posibilidad de que las diferencias numéricas sean el resultado de la variabilidad interespecífica entre sujetos de la misma edad o edades muy cercanas. Por tal razón, en el presente trabajo se proponen distribuciones de las frecuencias de diámetros axonales con sus respectivos intervalos de confianza. Se estudiaron 19 nervios normales distribuidos en tres grupos, considerando que la incidencia de desmielinización y degeneración de las fibras en sujetos normales se incrementa paulatinamente con la edad. Los nervios surales de 3 sujetos diabéticos de diferente edad fueron empleados para demostrar la utilidad de las distribuciones e intervalos propuestos.

OBJETIVOS .

1. CARACTERIZAR LAS CURVAS DE DISTRIBUCION DE DIAMETROS AXONALES DEL NERVIO SURAL NORMAL EN SUJETOS DE DIFERENTE EDAD.
2. CALCULAR LOS LIMITES DE VARIACION PARA TALES DISTRIBUCIONES.

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvo un segmento del nervio sural de 19 individuos que no presentaron enfermedad neurológica, sistémica o adicción que pudiera provocar daño al sistema nervioso periférico. De estos sujetos 13 fueron del sexo masculino y 6 del sexo femenino. La edad entre 1 a 55 años se dividió en 3 grupos para su estudio. El primer grupo de 1 a 8 años comprende el periodo de desarrollo del nervio; el segundo, de 9 a 35 años, el periodo de madurez y en el tercero, 36 a 55 años, la etapa en la que comunmente se presentan cambios degenerativos por la edad.

Se incluyeron 3 biopsias de pacientes diabéticos para probar las distribuciones normales.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las fibras del nervio sural provienen del ganglio S₁ de la raíz dorsal. Este nervio pasa a lo largo del borde lateral del tendón de Aquiles y detrás del maleólo externo hasta el borde lateral del pie, donde puede ser disecado fácilmente (Behse, 1990).

Bajo anestesia local se extrajeron 2 centímetros de largo del nervio sural en la región del maleólo externo. El fragmento obtenido se colocó en una tira de papel cartulina por

20 segundos para evitar la retracción de la muestra. En seguida se embebió en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilatos al 0.1 M y a un pH de 7.4, por 5 minutos. Posteriormente se seccionaron cilindros de 3 milímetros de longitud y de 1 milímetro de diámetro. Estos fueron fijados por una hora en la solución antes mencionada. Al término se realizó la postfijación en tetraóxido de osmio al 0.5 % por 1 hora, en seguida se deshidrataron las muestras en acetona gradual del 70, 80, 90 y 100 % , por 15 minutos en cada una, se preincluyeron en una mezcla de resina epóxica y acetona (1:1) por 12 horas. Cada cilindro se incluyó en resina epóxica Glycide ether 100 y se polimerizaron a 60°C por 16 horas.

Del material procesado se cortaron secciones transversales finas y ultrafinas en un ultramicrotomo C. Reichert . Las secciones finas se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina para la cuantificación de las fibras mielínicas, mientras que para la evaluación morfométrica de las fibras amielínicas se utilizaron las secciones ultrafinas correspondientes al área gris-plata del espectro de colores de interferencia, contractadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (fig.9).

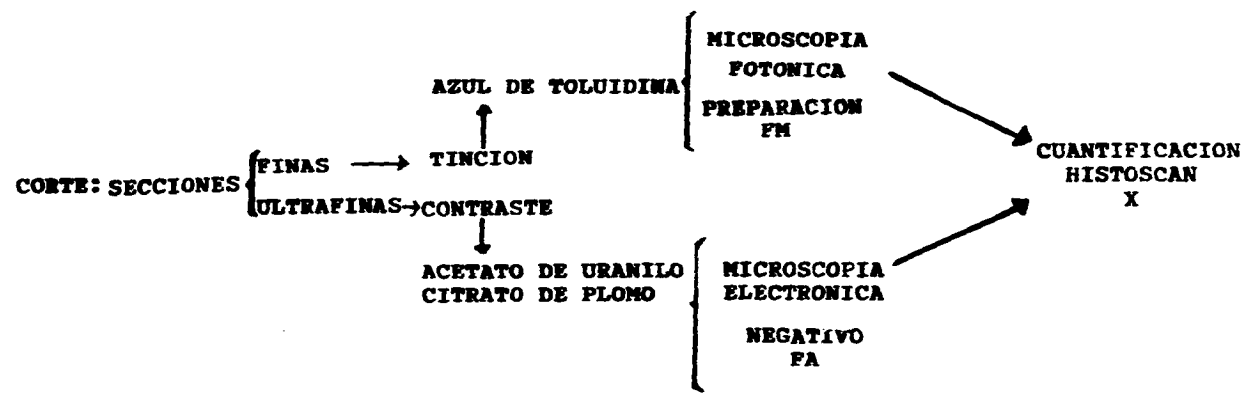
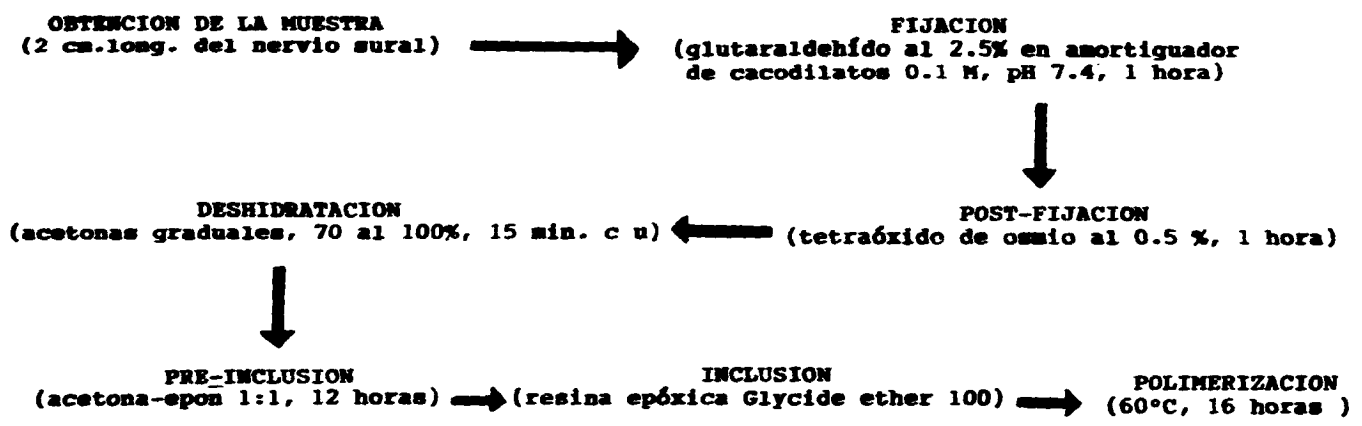


Fig.9. Diagrama que resume el procesamiento de las muestras en el laboratorio.

CUANTIFICACION DE LAS FIBRAS MIELINICAS

Las preparaciones teñidas con azul de toluidina se colocaron en una platina motorizada MARSHAUSER MCL del microscopio OLYMPUS BH-2 para ser analizadas morfológicamente con el procesador y analizador automático de imágenes HISTOSCAN X (Corkidi, 1989; Hirsch y col., 1992).

De cada preparación se registró el área fascicular con el objetivo de 4X. El fascículo se dividió en cuadrantes que posteriormente se analizaron a 20X para medir las fibras y eliminar artefactos de manera automática.

Se creó un archivo de imágenes de los cuadrantes que abarcaba cada fascículo, para evitar los errores de precisión en la localización de los campos al mover la preparación manualmente, además de evitar el conteo repetido o la omisión de una zona determinada. Las imágenes se procesaron para obtener un mejor contraste de las fibras, para eliminar los artefactos y corregir los contornos mal trazados e incluir las fibras omitidas (fig. 10).

Se determinó automáticamente el número de fibras mielínicas por mm^2 y su diámetro equivalente. Este último se consideró necesario ya que anteriormente para medir contornos de las fibras irregulares se obtenía un promedio de varios diámetros internos que dan como resultado un valor aproximado al diámetro equivalente. En el presente trabajo se midió el área del axón en sección transversal, de donde se derivó

el diámetro equivalente al considerar la sección axonal como un círculo perfecto. La fórmula para calcularlo se define así: $2\sqrt{S/\pi}$, donde S es el área contenida dentro del contorno de la fibra.

CUANTIFICACION DE LAS FIBRAS AMIELINICAS

Las secciones ultrafinas se observaron al microscopio de transmisión Zeiss EM10 operado a 60 Kv. Se fotografiaron entre 8 y 10 campos por caso y los negativos correspondientes se colocaron en una pantalla de transparencias y con ayuda de una cámara de video se transfirió la imagen al programa HISTOSCAN X en la computadora. La cuantificación de las fibras amielínicas se realizó de manera semiautomática. Primero se midió el área de estudio calibrando el sistema de morfometría con respecto a la magnificación del microscopio electrónico. Posteriormente se eliminaron los artefactos, se marcaron las áreas axonales y se registró el número y diámetro equivalente de las fibras amielínicas.

La cantidad de fibras mielínicas y amielínicas se expresó en densidades (número de fibras por unidad de área).

Se elaboraron histogramas de frecuencias de los diámetros axonales por grupo de edad. Para la distribución de los datos de las fibras mielínicas se empleó una mezcla de distribuciones log-normales que responde al comportamiento bimodal y asimétrico de la muestra, además de que su recorrido en el eje horizontal es siempre positivo. Para el caso de las

fibras amielínicas se utilizó una distribución log-normal simple ya que los datos se distribuyen de manera unimodal y asimétricamente (Macdonald y Green, 1985).

La distribución log-normal se representa así:

$$\frac{p}{x\sqrt{2\pi s^2}} \exp(-(\ln(x) - m)^2/2s^2)$$

donde m y s son parámetros de localización y escala respectivamente.

Entonces, una mezcla de distribuciones se representa como:

$$\frac{p_1}{x\sqrt{2\pi s_1^2}} \exp(-(\ln(x) - m_1)^2/2s_1^2) + \frac{p_2}{x\sqrt{2\pi s_2^2}} \exp(-(\ln(x) - m_2)^2/2s_2^2)$$

donde p_1 y p_2 son parámetros estimados que representan el peso de cada función.

Ahora, los valores esperados serán calculados con la siguiente función:

$$p_1 \int_{L_1}^{L_2} \frac{1}{x\sqrt{2\pi s_1^2}} \exp(-(\ln(x) - m_1)^2/2s_1^2) dx + p_2 \int_{L_1}^{L_2} \frac{1}{x\sqrt{2\pi s_2^2}} \exp(-(\ln(x) - m_2)^2/2s_2^2) dx$$

p_1 , p_2 , m_1 , m_2 , s_1 , y s_2 se muestran en la tabla 5. L_1 y L_2 son los límites superior e inferior de cada categoría.

Los límites de variación se obtuvieron a partir de los puntos de la distribución \pm su desviación estándar.

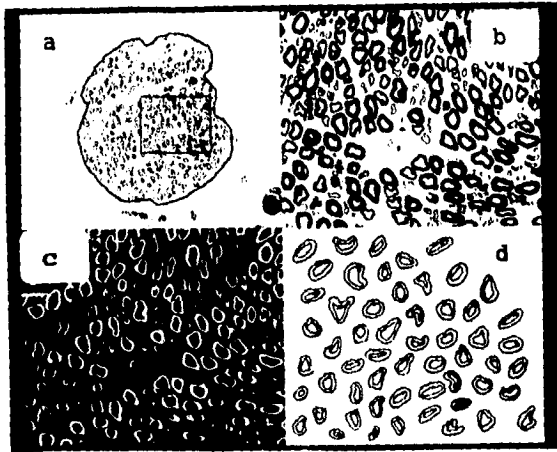


Fig. 10. Procesamiento de imágenes. a) exploración automática con el objetivo de 4X; el contorno en negro indica los límites del fascículo y el cuadro interno el área que se va analizar a mayor aumento. b) área observada a 20X, imagen con un proceso de mejoramiento en el contraste de las fibras. c) imagen invertida (fondo negro, mielina en blanco) para simplificar la segmentación de las fibras. d) contornos internos y externos de las fibras después de la eliminación automática de artefactos y corrección manual de contornos mal trazados o fibras omitidas.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados de la cuantificación de las fibras mielínicas y amielínicas de los sujetos normales y diabéticos.

En la tabla 2 se presentan los rangos de las densidades de ambos tipos de fibras por cada grupo estudiado. Además incluye las densidades de las fibras mielínicas de los sujetos diabéticos.

El rango total de densidad es de 5149-15884/mm² y de 14342-67006/mm² para las fibras mielínicas y amielínicas respectivamente en sujetos normales de 1 a 55 años. En el caso de los pacientes con neuropatía periférica (diabéticos) las densidades de fibras mielínicas se ubicaron por abajo de las normales (tabla 2).

Los histogramas de frecuencia de diámetros axonales de las fibras mielínicas de los sujetos normales presentaron un comportamiento bimodal. Los diámetros de máxima frecuencia para el grupo de 1-8 años se localizaron entre 4-5 μm y entre 8-9 μm con una frecuencia de 17% y 13% respectivamente (fig.11A). Para el grupo de 9-35 años el primer diámetro más representativo se mantiene entre 4-5 μm con una frecuencia de 16% y el segundo entre 9-10 μm con una frecuencia de 9% (fig.11B). En el último grupo, de 36-55 años, el primer diámetro se amplía de 3-5 μm , con una frecuencia de 15%, y

el segundo se desplaza a un diámetro mayor de 11-12 μm con una frecuencia de 7.5% (fig.11C).

Para los sujetos diabéticos se encontró que en el caso de 39 años el primer pico en el histograma de frecuencias de diámetros axonales se localizó entre 3-4 μm con una frecuencia de 31% y el segundo entre 8-9 μm con una frecuencia de 6% (fig.12A). En el sujeto de 58 años los diámetros representativos se ubicaron entre 5-6 μm y entre 12-13 μm , la frecuencia de 16% para cada uno (fig.12B). El último caso, de 62 años, presentó una frecuencia máxima de 18% en el diámetro de 6-7 μm y la otra de 25% en un diámetro muy cercano al primero, entre 8-9 μm . En este caso se aprecia una tendencia a perder el comportamiento bimodal (fig.12C).

Para las fibras amielínicas de los sujetos normales el diámetro más representativo se localizó entre 1.25-1.50 μm en todos los grupos, la frecuencia fue de 32% para el grupo de 1-8 años (fig.13A), de 33% para el de 9-35 años (fig.13B) y de 29% para el último grupo (36-55 años) (fig.13C). (Ver resumen en tabla 3).

Se incluye una tabla comparativa sobre densidades de las fibras del nervio sural de acuerdo a diversos autores. (tabla 4).

GRUPO	EDAD/SEXO	DENSIDAD FM	No.FM	AREA FASCICULAR ESTUDIADA (mm ²)	DENSIDAD FA	No.FA	AREA FASCICULAR ESTUDIADA (mm ²)
I	18 m/M	12664	734	0.0579	20578	124	0.00602
	18 m/M	12374	1140	0.0921	21199	137	0.00646
	21 m/F	13527	574	0.0424	18120	86	0.00474
	2 a/M	11442	1267	0.1107	67006	421	0.00628
	2 a/F	15884	516	0.0325	28148	163	0.00579
	8 a/M	11863	773	0.0652	60166	269	0.00447
	8 a/M	12496	943	0.0747	41110	162	0.00394
II	12 a/M	10030	1367	0.1363	36731	219	0.00596
	17 a/F	8701	1101	0.1265	21255	112	0.00526
	18 a/M	9253	1101	0.0814	17641	109	0.00618
	21 a/M	6046	900	0.1488	28488	176	0.00618
	26 a/F	7098	423	0.0596	25342	144	0.00568
	27 a/F	8553	612	0.0715	14342	125	0.00871
	31 a/M	8111	993	0.1224	18040	110	0.00610
32 a/M	9282	898	0.0967	30511	210	0.00688	
III	38 a/F	7679	1269	0.1652	27783	176	0.00633
	43 a/M	9084	776	0.0854	19156	119	0.00621
	44 a/M	7668	712	0.0928	21616	137	0.00637
	55 a/M	5149	778	0.1511	14934	90	0.00603
IV	39 a/M	2625	175	0.0663			
	58 a/M	4491	344	0.0761			
	62 a/F	2502	418	0.1667			

Tabla 1. Edad, sexo y datos cuantitativos del nervio sural de 19 sujetos normales y 3 diabéticos.

m=meses a=años M=masculino F=femenino FM=fibras mielínicas FA=fibras
 I,II Y III=sujetos normales IV=sujetos diabéticos amielínicas
 Densidad = número de fibras/ mm².

GRUPO	DENSIDAD FM	DENSIDAD FA
1-8 años	11442-15884	18120-67006
9-35 "	6046-10030	14342-36731
36-55 "	5149-9084	14934-27783
39 "	2625	
58 "	4491	
62 "	2502	

Tabla 2. Muestra los rangos de densidad para cada grupo estudiado, así como las densidades de los sujetos diabéticos.

La densidad representa el número de fibras por milímetro cuadrado. FM = fibras mielínicas ; FA = fibras amielínicas.

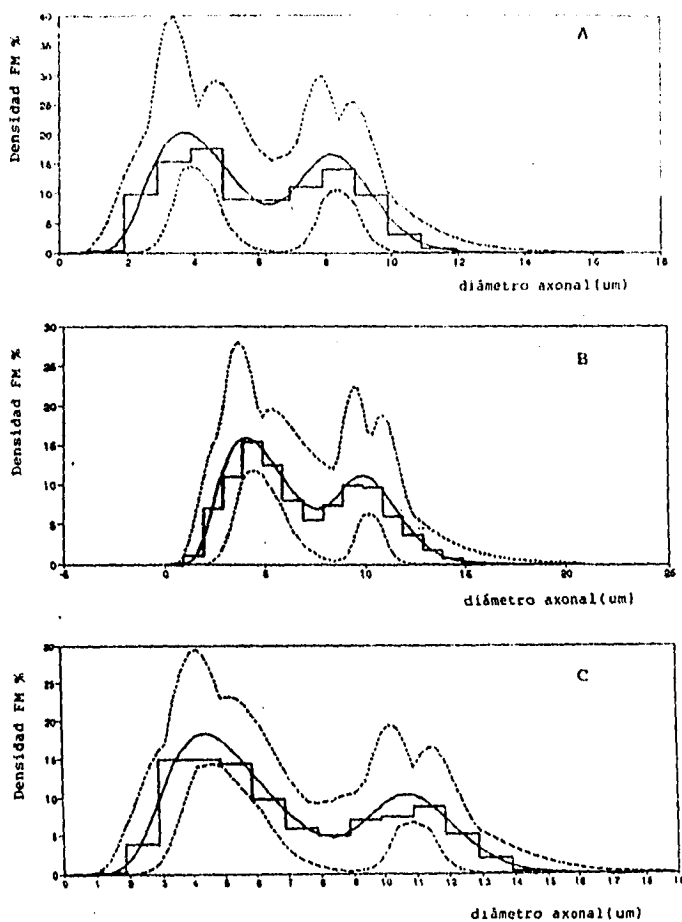


Fig. 11. Histogramas, mezcla de distribuciones log-normales y desviación estandar (línea punteada superior e inferior) del diámetro externo de las fibras mielínicas para los grupos de: 1-8 años (A), 9-35 años (B), 36-55 años (C).

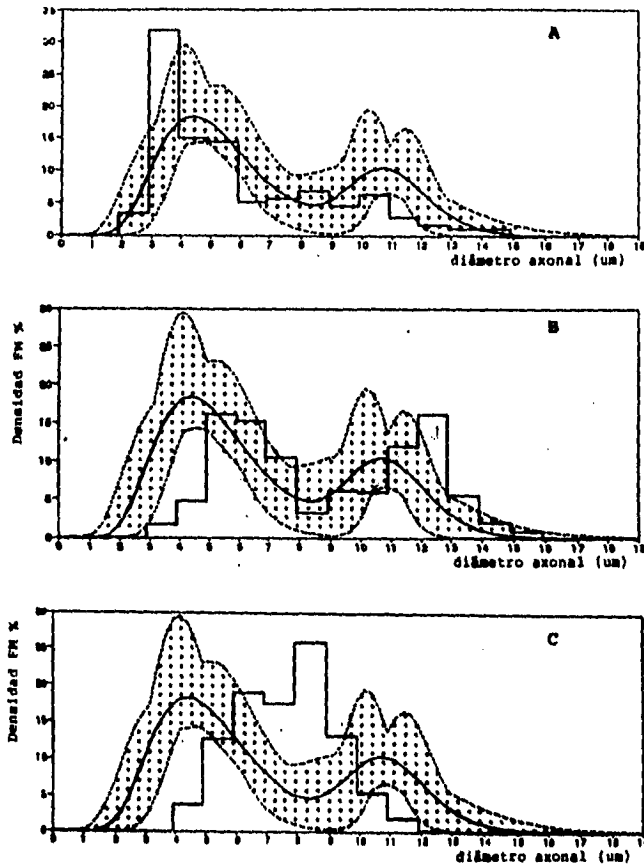


Fig. 12. Histogramas de frecuencia del diámetro externo de las fibras mielínicas de 3 pacientes diabéticos y sobrepuesta (área punteada) la mezcla de distribuciones log-normales del grupo control (36-55 años) con el que se están comparando. Paciente A(39 años) B(58 años), C(62 años).

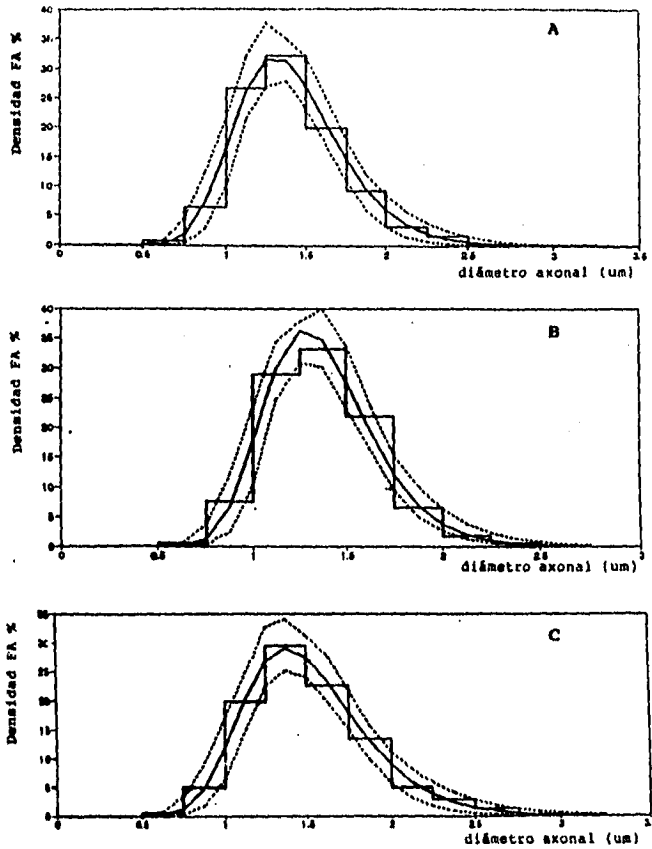


Fig. 13. Histogramas, distribución log-normal y desviación estandar (línea punteada superior e inferior) del diámetro de las fibras amielínicas para los grupos: 1-8 años (A), 9-35 años (B), 36-55 años (C). FA= fibras amielínicas.

		FIBRAS MIELINICAS				FIBRAS AMIELINICAS	
GRUPO		Ø	Fr	Ø	Fr	Ø	Fr
NORMALES	1-8 años	4-5 µm	(17%)	8-9 µm	(13%)	1.25-1.50 µm	(32%)
	9-35 años	4-5 µm	(16%)	9-10 µm	(9 %)	"	(33%)
	36-55 años	3-5 µm	(15%)	11-12 µm	(7.5%)	"	(29%)
DIABETICOS	39 años	3-4 µm	(31%)	8-9 µm	(6 %)		
	58 años	5-6 µm	(16%)	12-13µm	(16%)		
	62 años	6-7 µm	(18%)	8-9 µm	(25%)		

Tabla 3 .Representación numérica de los diámetros con mayor frecuencia para las fibras mielínicas y amielínicas de los sujetos estudiados.

Ø = diámetro ; µm = micrómetro ; Fr = frecuencia

AUTOR	DENSIDAD FM	DENSIDAD FA	INTERVALO DE EDAD
Ochoa y Mair (1969a)	7000-10000/mm	21755-33859/mm	15-59 años
Dyck y col. (1971)		19447-68813/mm	7-66 años
Behse y col. (1975)		19000-56900/mm	17-47 años
Low y col. (1978)		24700-51500/mm	12-54 años
Jacobs y Love (1985)	4080-12940/mm	17300-87200/mm	3-77 años
Ouvrier y col. (1987)	3810-11850/mm		1-50 años
Behse (1990)	5200-7900 /mm		14-54 años
En el presente trabajo	5149-15884/mm	14342-67006/mm	1-55 años

Tabla 4 . Muestra las densidades reportadas por varios autores para la fibras mielínicas (FM) como para las amielínicas (FA) de sujetos normales.

	GRUPO años	MEDIA	VARIANZA	p1	m1	s1	p2	m2	s2
F I B R A S M I E L I N I C A S	1-8	5.9531	1.0446	0.6277	1.4320	0.1209	0.3723	2.1304	0.0172
	9-35	6.9381	1.2908	0.6890	1.5887	0.1837	0.3110	2.3328	0.0209
	36-55	6.9475	1.1277	0.7156	1.6079	0.1307	0.2844	2.3923	0.0146
	1-8	1.4170	0.3342	1	0.3215	0.0541			
	9-35	1.3504	0.2861	1	0.2785	0.0439			
	36-55	1.4988	0.3627	1	0.3762	0.9549			

Tabla 5. Media, varianza y parámetros estimados para las distribuciones log-normales de las fibras mielínicas y amielínicas del nervio sural normal humano.

p = peso de la función

m = parámetro de localización

s = parámetro de escala

D I S C U S I O N

Pocos autores han estudiado los cambios morfológicos del nervio sural normal humano en sujetos de diferente edad. Además no se han encontrado reportes en los que se comparen las diferencias entre individuos de la misma edad, ni tampoco se han calculado los límites de normalidad para las distribuciones propuestas por diferentes autores para las fibras mielínicas y amielínicas del nervio sural.

En la información recopilada sobre la cuantificación de las fibras del nervio sural normal humano se encontraron resultados cercanos a los presentados en este trabajo, aunque también se dan ciertas diferencias con algunos autores.

Ochoa y Mair (1969a) reportan una densidad de 7000 - 10000 FM / mm² en sujetos de 15 a 55 años, Jacobs y Love (1985) encuentran una densidad de 7500-10000 FM/mm² para sujetos de 10 a 60 años y Behse (1990) una densidad de 5200-7900 FM/mm² en individuos de 14 a 54 años, mientras que en el presente se reportan 5149-10030 FM/mm² para sujetos de 12 a 55 años, edades cercanas a las estudiadas por estos autores.

Ouvrier y col. (1987) reportaron una densidad de 3810-11850 FM / mm² para sujetos de 1 a 59 años y Jacobs y Love una densidad de 4080-12940 FM/mm² considerando sujetos de 3 a 77 años. Para este estudio la densidad fue de 5149 - 15884 FM / mm² en individuos de 1 a 55 años

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Con relación a las densidades de las fibras amielínicas en el presente trabajo se encontraron de 14342-67006 FA/mm² en sujetos de 1-55 años. Ochoa y Mair (1969a) presentan datos que oscilan entre 21755-33859 FA/mm² para sujetos de 15 a 59 años, Dyck y col. (1971) reportan 19447-68813 FA/mm² en sujetos de 7 a 66 años y Behse y col. (1975) presentan densidades de 19000-56900 FA/mm² para sujetos de 17 a 47 años.

Tomando en cuenta que el valor máximo y mínimo de la densidad de ambos tipos de fibras depende del rango de edad de los sujetos involucrados en el estudio, en el presente trabajo se proponen 3 grupos de edad para la evaluación morfométrica del nervio sural. El primero se estableció de 1-8 años, considerando que durante este periodo las capas de mielina se incrementan proporcionalmente al calibre del axón y que la densidad de las fibras del nervio sural, que es muy alta al nacimiento se mantiene en un número relativamente constante (Toghi y col., 1977), después de que gran parte de ellas ha degenerado durante los primeros meses de vida (Gutrecht y Dyck, 1970; Toghi y col., 1977; Origuachi, 1981).

El segundo grupo, descrito para sujetos de 9 a 35 años, se basa en el crecimiento circunferencial y axial de las capas de mielina y en el incremento transversal del área fascicular, lo que trae como consecuencia un decremento ligero en la densidad de las fibras (Ouvrier y col., 1981).

El tercer grupo es propuesto para sujetos de 36 a 55

años, ya que en este rango de edad se ha observado que el área fascicular se mantiene constante, con procesos de degeneración axonal normal que es acompañada por suficiente regeneración como para mantener las densidades de las fibras dentro de los valores normales.

Los histogramas de frecuencia de diámetros axonales de las fibras miélicas y amielínicas de los sujetos estudiados se presentan de acuerdo a los grupos mencionados y no de manera individual como se han reportado anteriormente, al igual que sus distribuciones y límites de variación.

La veracidad de los resultados reportados por un determinado autor se ve afectada cuando se comparan con los de otro u otros, ya que no se habían planteado límites de variación que permitan contemplar las diferencias que pudieran existir entre individuos de la misma edad o edades muy cercanas, además es inadecuado generalizar los resultados que se obtienen en un estudio con pocos sujetos y que no abarcan o representan un amplio rango de edad en el que se considere el crecimiento, maduración y degeneración axonal.

Las distribuciones propuestas se presentaron con sus límites de variación y se compararon con los histogramas de 3 pacientes con neuropatía periférica (diabéticos), corroborando la aplicabilidad de tales distribuciones, ya que sus densidades son menores a las de los sujetos normales (tabla 4).

Respecto a las diferencias en las densidades de las fibras del nervio sural normal humano, obtenidas en este trabajo y con relación a las reportadas por otros autores, deben considerarse 3 factores principales. Uno de estos es la fijación del tejido en soluciones hiperosmolares que ocasionan un incremento del área endoneural, mientras que el número de las fibras no puede ser alterado. La consecuencia es una densidad disminuida (Gutrech y Dyck, 1970; Dyck y col., 1971). En el presente estudio se utilizó un fijador isosmolar preparado con glutaraldehído al 2.5 % amortiguado con buffer de cacodilatos al 0.1 M, a un pH de 7.4. Otro factor a considerar, es el caso contrario, la disminución del área endoneural por compresión del tejido con igual número de fibras, por lo que la densidad, en este caso es mayor (Tohgi y col., 1977). Este problema puede ser resuelto con un manejo cuidadoso durante la disección del tejido y su manipulación previa a la fijación. Finalmente debe tomarse en cuenta el método empleado en la cuantificación de las fibras, ya que durante la observación al microscopio a 20X o 40X, aumentos en los que se aprecian mejor las fibras pequeñas, se puede perder la direccionalidad de los campos repitiéndose u omitiéndose algunas áreas. De igual forma sucede con las secciones a fotografiar al microscopio electrónico. En este trabajo se utilizó un procesador digital de imágenes, un microscopio fotónico con platina motorizada y un programa,

HISTOSCAN X, equipo con el cual se delimitan las áreas de estudio, se seccionan y se analizan por cuadrantes de manera semiautomática, evitando los errores manuales de precisión y apreciativos. También se miden perímetros, áreas, diámetros, entre otros parámetros; procesa los datos, saca promedios y se pueden utilizar programas alternos para la elaboración de histogramas u otros tipos de representaciones gráficas. Con esto, el trabajo tan laborioso de fotografiar y medir manualmente se reduce a colocar la laminilla en el microscopio o el negativo en una pantalla y a operar el programa.

CONCLUSIONES

1. Con las curvas de distribución propuestas para las fibras miélfínicas y amielínicas del nervio sural normal humano se pueden contemplar las diferencias de densidades encontradas por otros autores como una variación normal entre individuos y en algunos casos como diferencias técnicas.
2. Los límites de normalidad son útiles en la interpretación de las biopsias del nervio sural humano durante la práctica patológica quirúrgica.
3. El procesamiento digital de imágenes es un sistema que facilite la cuantificación de las fibras, la toma de datos y la elaboración rápida de los histogramas de frecuencias de diámetros axonales, entre otras ventajas, por lo que sería exitoso emplearlo como método de rutina en trabajos que requieran de precisión, rapidez y demás evaluaciones específicas para cada tipo de estudio. Además puede ser adaptado para medir diversas estructuras.
4. Los tres histogramas de pacientes diabéticos comprueban la aplicabilidad de las distribuciones propuestas para determinar los casos de neuropatía periférica.
5. La intención de éste trabajo es aplicarlo como criterio de referencia en la interpretación de neuropatía periférica en diferentes poblaciones.

B I B L I O G R A F I A

- Asbury AK, Johnson PC. Pathology of peripheral nerve. WB Saunders, Philadelphia, 311p, 1978.
- Behse F. Morphometric studies on the human sural nerve. Acta-Neurol-Scand-Suppl. 82 132(1-38)1990.
- Behse F, Buchthal F, Carlsen F, Knappels GG. Unmyelinated fibres and Schwann cells of sural nerve in neuropathy. Brain.Sep;98(3):493-510.1975.
- Beresford WA. Lo esencial de la Histología. El manual moderno, 266p, 1975.
- Bradley WG, Asbury AK. Radioautographic studies of Schwann cell behavior. I. Acrylamide neuropathy in the mouse. J. Neuropathol. Exp.Neurol.29:500,1970.
- Bruce MF. The relation of tactile thresholds to histology in fingers of elderly people. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 43,730-734,1980.
- Carlsen F, Behse F. Three dimensional analysis of Schwann cells associated with unmyelinated nerve fibres in human sural nerve. J.Anat 130:545-557,1980.
- Carlson BM. Embriología básica de Patten. Interamericana-Mc Graw-Hill, México, 770p,1990.
- Corkidi G. Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique HISTO 2000. Thèse de doctorat , Université Paris XII.1989.

- Cornack DH.** Histología de Ham. HARLA, México, 1988.
- Dyck PJ, Lambert EH, Nichols PC.** Quantitative measurement of sensation related to compound action potential and number and sizes of myelinated y inmyelinated fibres of sural nerve in health, Friedreich's ataxia, hereditary sensory neuropaty, and tabes dorsalis. In: Rémond A (ed) Handbook of electroencephalography and clinical neurophysiology. Elsevier, Amsterdam, vol 9, pp 9.83-9.118. 1971.
- Fawcett DW.** Tratado de histología. Interamericana, McGraw - Hill, México, 1026 p, 1991.
- Gutrecht JA, Dyck PJ.** Quantitative teased-fiber and histologic studies of human sural nerve during postnatal development. J Comp Neurol 138:117-130, 1970.
- Guyton AC.** Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Interamericana. México, 299p, 1972.
- Hirsch EC, Lejeune O, Colliot G, Corkidi G, Tajani M.** Computer methods in nuclei cartography. Methods in neurosciences, vol 10, 62-79. Academic Press, 1992.
- Jacobs JM, Love S.** Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at diferent ages. Brain 108, 892-924, 1985.
- Junqueira LC, Carneiro J.** Histología básica. Salvat, México, 544p, 1990.
- Low PA, McLeod JG, Prineas JM.** Hypertrophic Charcot-Marie -

- Tooth disease. Light and electron microscope studies of the sural nerve. *J. Neurol Sci* 35:93-115, 1978.
- Macdonald PDM, Green PEJ. User's guide to program MIX: An interactive program for fitting mixture of distributions. Ichthus data systems. Ontario, Canada, 1985.
- Merritt HH. A textbook of Neurology. Philadelphia, Lea & Febiger, 961 p. 1979.
- Moore JL. Embriología clínica. Iberoamericana McGraw-Hill . México, 550p, 1988.
- Murray LB, Kiernan AJ, El sistema nervioso humano. HARLA . México, 476p, 1986.
- Ochoa J. Recognition of unmyelinated fiber disease: morphologic criteria. *Muscle & Nerve* 1:375-387, 1978.
- Ochoa J, Mair WGP. The normal sural nerve in man. I. Ultrastructure and numbers of fibres and cells. *Acta Neuropath(Berl)* 13, 197-216, 1969a.
- Ochoa J, Mair WGP. The normal sural nerve in man. II. Changes in the axons and Schwann cells due to ageing. *Acta Neuropath(Berl)* 13, 217-239, 1969b.
- Origuachi Y. Quantitative histological study in the sural nerves of children. *Brain Dev.* 3:395-402, 1981.
- Ouvrier RA, McLeod JG, Conchin T. Morphometric studies of sural nerve in childhood. *Muscle-Nerv.* 10 1(47-53) 1987.

- Ouvrier RA, McLeod JG, Morgan JG, Wise GA, Conchin T. Hereditary motor and sensory neuropathy of neuronal type with onset in early childhood. *J Neurol Sci* 51:181-197, 1981.
- Rubin E, Farber JL. *Patología. Panamericana, México, 1420 p* 1990.
- Sadler TW. *Embriología especial. Panamericana, México, 424p,* 1990.
- Schafer K, Friede RL. The onset and rate of myelination in six peripheral and autonomic nerves of the rat. *J. Anat;* Aug;15a;p181-95;1988.
- Shield LK, King RHM, Thomas PK. A morphometric study of human fetal sural nerve. *Acta-Neuropathol* 70 1(60-70)1986.
- Tatárinov VG. *Anatomía y fisiología humanas. Editorial Mir, Moscú, 376p, 1980.*
- Thomas PK. The cellular response to nerve injury, 3. The effect of repeated crush injuries. *J. Anat.* 106:463, 1970.
- Tohgi H, Tsukagoshi H, Toyokura Y. Quantitative changes with age in normal sural nerves. *Acta Neuropathol (Berl)* 38: 213-220, 1977.
- Ziskind-Conhaim L. Physiological and morphological changes in developing peripheral nerves of rat embryos. *Brain-Res;* jul 1;470(1);p15-28;1988.