

168
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVOLUCION CUANTITATIVA DE CELULAS DE
SCHWANN, FIBROBLASTOS Y MACROFAGOS EN
NERVIO CIATICO, CON Y SIN LESION POR
SECCION, EN RATAS ADULTAS

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 :

LUZ COLUMBA VELASCO SANJUAN



DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

1997

FACULTAD DE CIENCIAS
SERVICIO ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
EVOLUCION CUANTITATIVA DE CELULAS DE SCHWANN, FIBROBLASTOS Y MACROFAGOS
EN NERVI0 CIÁTICO, CON Y SIN LESION POR SECCION, EN RATAS ADULTAS

realizado por VELASCO SANJUAN LUZ COLUMBA

con número de cuenta 7916656-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. EN C. HERMELINDA SALGADO CEBALLOS

Propietario M. EN C. ARMANDO PEREZ TORRES

Propietario BIOL. VIRGINIA ESMERALDA URBIETA UBILLA

Suplente DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRIGUEZ

Suplente BIOL. ANA MARIA VELASCO VELASCO



M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

Armando Pérez Torres

Virginia Esmeralda Urbieta Ubilla

Ana María Velasco U.

**A
MIS PADRES
FRANCISCO Y DELFINA**

**HERMANOS
Ri
Rodrigo
Gaby
Tere**

**AMIGOS
Gladys
Italia
Alejandro
Juan Carlos**

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Armando Pérez Torres, por su disposición y valiosa cooperación, a la Biól. Martha Ustarroz, a la Biól. Diana Millán, por su apoyo con la metodología inmunohistoquímica. Facultad de Medicina, U.N.A.M.

A la Biól. Virginia Urbista, a la Dra. Martha Escobar, a la Biól. Ana María Velasco, por la revisión de este trabajo. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

Al Dr. Efrén Grizava, al Dr. Gabriel Guizar, a la MVZ. Angelina Martínez, a la M. en C. Patricia García, a la M. en C. Griselda Fuentes, a los Sres. Harari, Proyecto Camina A. C.

A la Sra. Patricia Quintana.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Gabby, Andras, Ana Laura, Alberto, Judith, Laura B., Sr. Guillermo y fam., Sr. Fidel López, Sra. Enna, Sra. Mary, Adriana y Samuel.

Especialmente a la M. en C. Hermelinda Salgado Ceballos por todo el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

INDICE

pag.

Resumen	1
Introducción	2
Características anatómicas del nervio ciático	2
Características histológicas del nervio periférico	3
Desarrollo de la lesión del nervio periférico	5
Respuesta de las células de Schwann durante la lesión del nervio	7
Respuesta de los fibroblastos durante la lesión del nervio	8
Respuesta de los macrófagos durante la lesión del nervio	9
Antecedentes sobre estudios de lesión en nervio periférico	12
Marcadores inmunológicos para células de Schwann, fibroblastos y macrófagos	14
Justificación	16
Problema	16
Hipótesis	17
Objetivo	17
Metodología	18
Criterios de inclusión y exclusión	23
Consideraciones éticas	23
Análisis estadístico	23
Resultados	26
Discusión	38
Conclusiones	43
Perspectivas	43
Referencias bibliográficas	44

ABREVIATURAS

NC: nervio cático

NP: nervio(s) periférico(s)

SNP: sistema nervioso periférico

CS: célula(s) de Schwann

DW: degeneración Walleriana

PDGF: factor de crecimiento derivado de la plaqueta

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

GGF: factor de crecimiento glial

TGF: factor transformante de crecimiento

NGF: factor de crecimiento nervioso

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

N-CAM: molécula de adhesión celular neural

IFN: interferón

IL: interleucina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Fc: región constante de la IgG

MPS: sistema fagocito-mononuclear

C3: componente tres del complemento

MHC: complejo principal de histocompatibilidad

NPP: nervio periférico prelesionado

SNC: sistema nervioso central

PBS: amortiguador salino de fosfatos

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado que el nervio periférico que es lesionado antes de ser utilizado como trasplante permite una mejor reparación del tejido dañado en comparación con los implantes de nervio periférico fresco; ya que el primero puede aumentar la regeneración del tejido receptor gracias a la contribución de las células de Schwann y los macrófagos que han sido activados por la lesión y que favorecen los procesos de regeneración, remielinización y plasticidad del sistema nervioso.

Sin embargo, es importante conocer el tiempo óptimo que requiere de lesión previa para que las poblaciones celulares intraneurales alcancen su máxima proliferación. Debido a la controversia que existe al respecto, el objetivo de este trabajo fue cuantificar, a diferentes tiempos postlesión, las poblaciones de células de Schwann, macrófagos y fibroblastos para determinar el momento en el cual cada tipo celular alcanza su máxima población.

El estudio se realizó en 24 ratas de la cepa Long Evans, hembras, adultas, divididas en tres grupos: control, maniobra y experimental; en este último se efectuó una lesión por sección transversal completa de la rama peroneal del nervio ciático en las dos extremidades posteriores. Las muestras del muñón distal del nervio se procesaron para inmunohistoquímica a 3, 7, 30 y 60 días después de la lesión, empleando el método estreptavidina-biotina-peroxidasa con los anticuerpos anti-S:100 y HIS43 para la identificación de células de Schwann y fibroblastos, respectivamente, y la identificación de macrófagos por histoquímica enzimática para esterasa inespecífica.

Los resultados obtenidos indican que el pico de máxima proliferación para células de Schwann se presentó al mes posterior a la lesión y para fibroblastos a los dos meses, mientras que la máxima población de macrófagos se observó a los siete días.

Con base en los resultados de la cuantificación realizada mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas y de histoquímica enzimática, después de la sección completa de la rama peroneal del nervio ciático de ratas adultas de la cepa Long Evans, se sugiere que el nervio periférico para trasplante se someta a una prelesión con un tiempo intermedio entre los siete y los treinta días para obtener un número elevado de células de Schwann, y con ello lograr una mejor remielinización y al mismo tiempo contar con una alta población de macrófagos para favorecer la regeneración axonal.

INTRODUCCION

Características anatómicas del nervio ciático

El nervio ciático (NC) es un nervio periférico (NP) formado a partir de la unión de las fibras nerviosas de las raíces anteriores y posteriores de segmentos espinales lumbares y sacros L-5 a S-2 (figura 1a). Abandona la pelvis siguiendo distalmente hacia la región posterior del muslo donde inerva a los extensores del muslo y más adelante a los flexores de la pierna. En la parte inferior del muslo, el NC se divide en dos ramas principales, la tibial y la peroneal (figura 1b), las cuales emiten ramificaciones hasta la parte distal de las extremidades inferiores (Greene, 1983).

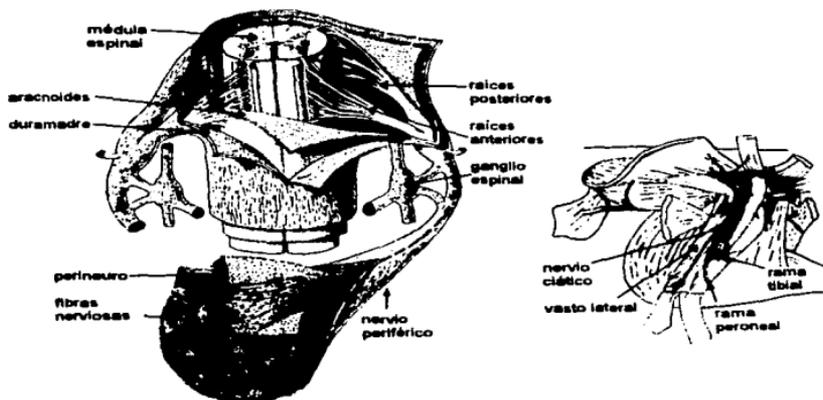


FIGURA 1. a) Origen anatómico del nervio ciático desde su emergencia a partir de las raíces posteriores y anteriores de la médula espinal. (Tomado de Krstic, 1989). b) División del nervio ciático en sus ramas tibial y peroneal (Tomado de Greene, 1983).

Características histológicas del nervio periférico

En el sistema nervioso periférico (SNP) los axones están protegidos por tres envolturas separadas de tejido conjuntivo: endoneuro, perineuro y epineuro, presentes a todo lo largo del nervio. Cada fibra nerviosa con sus respectivas células de Schwann (CS) son envueltas por un endoneuro de tejido conjuntivo formado por una fina malla de microfibrillas de colágena orientadas longitudinalmente, que está en contacto directo con la lámina basal de la CS y envuelve además a los capilares que nutren a la fibra nerviosa, fibroblastos, una población reducida de macrófagos residentes del NP y una menor cantidad de células cebadas, que se caracterizan por su gran tamaño y la presencia en su citoplasma de abundantes gránulos donde almacenan mediadores inflamatorios (Peters *et al.*, 1978; Krstic, 1989).

Las fibras nerviosas individuales se agrupan constituyendo fascículos ceñidos por un perineuro que anatómicamente es continuación de la aracnoides que envuelve a la médula espinal. El perineuro consta de una o varias capas celulares, según el diámetro del nervio, alternadas con redes de microfibrillas de colágena. Las células que forman este tejido son planas, escamosas y producen una delgada lámina basal en ambas caras celulares, que funciona como una barrera protectora semipermeable entre las fibras nerviosas y el tejido epineural; estas células son contráctiles debido a que contienen una gran cantidad de microfilamentos similares a los que poseen las células musculares lisas y producen fibrillas de colágena de forma semejante a los fibroblastos (Peters *et al.*, 1978; Krstic, 1989). Todo el conjunto de haces de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y una cantidad limitada de tejido adiposo se encuentra envuelto por el epineuro, formado por abundantes fibras de colágena onduladas longitudinalmente, representando una continuación del tejido conjuntivo denso que rodea al nervio e incluye también sus propios vasos sanguíneos y fibroblastos (Peters *et al.*, 1978; Krstic, 1989).

Las fibras del NP se clasifican en mielínicas y amielínicas (figura 2) de acuerdo a la presencia o no de la vaina que forman las CS alrededor del axón (Ross *et al.*, 1992). Las fibras amielínicas se originan por la asociación de los axones con las CS formando haces de aproximadamente 5 a 20 fibras inmersas en una misma CS la cual envuelve y protege al conjunto de axones a la vez que integran columnas continuas que se interdigitan a lo largo del NP (Ross *et al.*, 1992).

En las fibras mielinizadas, la vaina de mielina se produce cuando la CS envuelve al axón originando un estrecho contacto entre las caras externas de su membrana; paralelamente se forma una fina línea oscura llamada línea intraperiódica mientras que el citoplasma de la CS

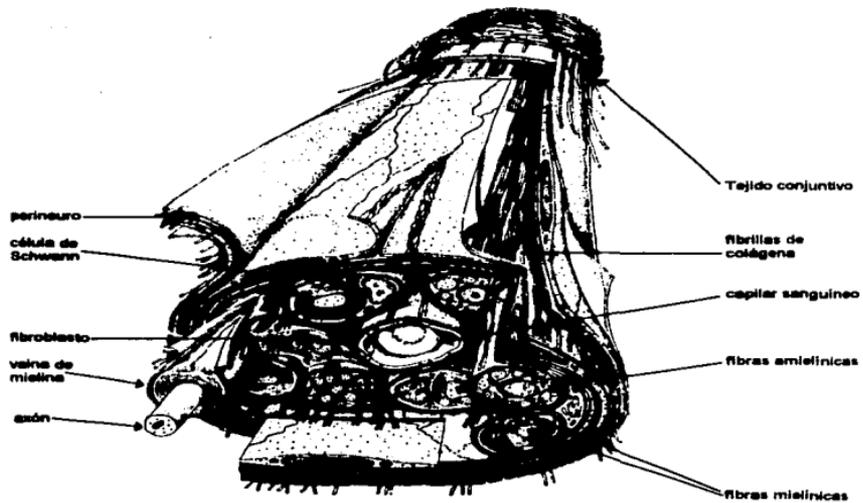


FIGURA 2. Haz de fibras nerviosas amielínicas inmersas en el citoplasma de las células de Schwann y fibras mielínicas con vainas formadas por estas células. (Tomado de Krstic, 1969)

es expulsado hacia el cuerpo celular, por lo que las caras internas de la membrana también se fusionan entre sí dando lugar a una línea densa mayor, de un espesor aproximado de 2 a 3 nm, que se encuentra separada por una línea intraperiódica en su región media, evidente como una zona más clara de aproximadamente 10 nm de espesor (Ham y Cormack, 1984). Una vez formada la vaina, ésta se interrumpe a intervalos en los nódulos de Ranvier por lo que cada segmento internodal se halla mielinizado por una sola CS. La fibra nerviosa y su vaina de mielina están rodeadas por una membrana basal que es secretada por la propia CS (Peters et al., 1976).

En la vaina de mielina existen zonas de discontinuidad llamadas incisuras de Schmidt-Lanterman que representan sitios donde el citoplasma de la CS quedó atrapado durante la mielinización (Friede y Samorajski, 1989), lo que permite la formación de canales citoplásmicos que atraviesan la CS en la espiral de mielina (Peters *et al.*, 1976). Aunque todavía hay controversia respecto a su papel específico, varios estudios sugieren que pueden llevar a cabo funciones que incluyen el mantenimiento metabólico de la vaina de mielina, el transporte de metabolitos desde la región externa hasta el interior del axón, la contribución en el movimiento peristáltico del axoplasma y el soporte que permite el crecimiento longitudinal de los segmentos internodales de la vaina (Thomas *et al.*, 1993). Por otro lado, Ghabriel y Alit (1981) han propuesto que las incisuras proveen los focos de segmentación durante el proceso de la degeneración walleriana (DW) o degeneración secundaria como consecuencia de la lesión en la prolongación axónica (Perry y Brown, 1992).

Desarrollo de la lesión del nervio periférico

La lesión en diferentes nervios periféricos ha permitido estudiar procesos de degeneración y regeneración de las fibras nerviosas con el fin de utilizarlos como tejido de implante en el sistema nervioso (Aguiayo *et al.*, 1978; Fawcett y Keynes, 1990; Thomas *et al.*, 1993).

Cuando el NP es lesionado directamente, como en la axotomía o sección completa de las fibras del nervio ciático, se presenta una etapa inicial de degeneración en la fibra nerviosa caracterizada por necrosis con inflamación aguda, infiltración de leucocitos alrededor de los muñones del nervio, abatimiento de la barrera hemato-nerviosa, degradación de la mielina y fagocitosis del tejido dañado en el segmento distal (Olsson y Sjostrand, 1969; Veerasuriya, 1988). El sitio de la herida es cubierto por un neuroma o tejido granular proliferativo compuesto de células no neurales, principalmente fibroblastos epi y endoneurales y CS del endoneuro (Bunge y Bunge 1983; Taniuchi *et al.*, 1986; Heumann *et al.*, 1987). Los cuerpos neuronales de las fibras lesionadas presentan una cromatólisis o alteración en la zona perinuclear que comprende desorganización de organelos, dispersión de ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso que conforma los cuerpos de Nissl, migración del núcleo hacia la periferia celular (Lieberman, 1971; Price y Porter 1972), y modificaciones en la expresión génica y el metabolismo celular asociados con la regeneración (Fawcett y Keynes, 1990).

El segmento axonal proximal sufre una degeneración primaria que se extiende a uno o dos segmentos internodales según el grado de lesión y la distancia con respecto al cuerpo neuronal; el segmento axonal distal sufre DW, es decir, inicialmente se presenta una

retracción, degeneración y eliminación del axón y de la vaina de mielina hasta varios segmentos internodales más allá del punto de lesión; durante las primeras horas después de la lesión, se presenta dentro del axón una desintegración del citoesqueleto y del axoplasma que con el transcurso del tiempo se transforman en restos granulares amorfos (Ham y Cornack, 1984; Ross *et al.*, 1992).

El evento que dispara la desintegración del citoesqueleto está asociado a un incremento en la concentración del calcio axoplásmico ya que el exceso de calcio libre intracelular activa proteasas neutras que actúan sobre los neurofilamentos (Schlaepfer y Bunge, 1973; Zimmerman y Schlaepfer, 1984). El calcio libre también activa fosfolipasas que junto con las proteasas actúan sobre la mielina provocando una desmielinización secundaria adicional a la ocasionada directamente por la lesión. En el área dañada, las mitocondrias y los neurofilamentos degeneran formando grupos más densos, posteriormente el axón sufre constricciones en varios puntos presentando una forma similar a un rosario que finalmente se fragmenta y disuelve (Ham y Cornack, 1984; Geneser, 1993). La degeneración axónica conduce a la pérdida en la capacidad de generar y transmitir el potencial de acción nervioso (Griffin *et al.*, 1993). Sin embargo, la regeneración en la fibra axónica comienza a las pocas horas de la axotomía, viniendo los primeros brotes de los nódulos de Ranvier terminales (Friede y Bischhausen, 1980).

Los eventos subsiguientes implican la activación y proliferación de diferentes células como fibroblastos y CS; activación y reclutamiento de macrófagos, tanto residentes del SNP como provenientes del torrente sanguíneo. Las CS que no han sufrido degeneración se multiplican y regeneran formando cordones celulares denominados tubos endoneurales o bandas de Büngner, que siguen los trayectos que tenían las fibras normales, a través de las cuales comienzan a recrear brotes axónicos a partir de las fibras restantes de los muñones proximal y distal (Thomas y Jones, 1967; Bray y Aguayo, 1974; Covault *et al.*, 1987).

La lesión directa sobre el NP también afecta la vascularización local y provoca la degranulación o exocitosis de las células cebadas, que son abundantes alrededor de vasos sanguíneos de pequeño calibre donde liberan diferentes mediadores como histamina y leucotrieno C que aumentan la permeabilidad vascular e inician el edema (Ross *et al.*, 1992). Los principales cambios a nivel vascular se manifiestan de dos formas: primero se observa un incremento en el diámetro de los vasos sanguíneos, relacionado con la infiltración de células hematógenas, principalmente polimorfonucleares y monocitos; más tarde se presenta un aumento en el número de vasos sanguíneos, asociado con una mayor demanda metabólica por la proliferación de las poblaciones celulares endoneurales y la remielinización durante la fase de regeneración nerviosa (Podhasky y Myers, 1993).

Respuesta de las células de Schwann a la lesión del nervio periférico

La proliferación de las CS *in vivo* se puede presentar bajo diferentes situaciones: durante el desarrollo embrionario (Martin y Webster, 1973); como consecuencia de la desmielinización primaria (Saida y Saida, 1988); durante la DW, después de la pérdida axonal (Bradley y Asbury, 1970) y en la regeneración axonal (Pellegrino *et al.*, 1986).

Después de la sección transversal completa en un NP la respuesta mitótica de las CS es intensa debido a la destrucción de mielina y la ausencia del axón (Miyamoto *et al.*, 1986), lo que provoca que las CS entren en contacto con moléculas que estimulan su proliferación. No obstante, el avance en el conocimiento de los factores que estimulan la proliferación de las CS y el cambio en su patrón de expresión génica después de lesión del NP, tanto los factores involucrados como el desarrollo posterior a la lesión son aún controvertidos (Fernández-Valle *et al.*, 1995).

Los mitógenos para CS identificados *in vitro* incluyen al factor de crecimiento derivado de leucocitos, al factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF), al factor de crecimiento fibroblástico (FGF), al factor de crecimiento glial (GGF), al factor transformante del crecimiento β_1 y β_2 (TGF); componentes de la matriz extracelular como laminina y fibronectina, y también los restos de mielina procesados por los macrófagos (Reff *et al.*, 1978; Baichwal *et al.*, 1988; Ratner *et al.*, 1988; Ridley *et al.*, 1989; Davis y Stroobant, 1990; Eccleston, 1992; Komiyama y Suzuki, 1992). Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* indican que tanto la membrana plasmática axonal como sus fragmentos, actúan como mitógenos para las CS y que el axón regula la formación de la membrana basal (Sironen *et al.*, 1992).

Por otra parte, estudios realizados por Friede y Beuche (1993) demostraron que la proliferación de las CS no se lleva a cabo si se inhibe el reclutamiento de macrófagos, ya que éstos participan en la producción de factores mitogénicos para CS y fibroblastos.

Durante la proliferación, las CS reexpresan genes característicos de CS en diferenciación (Pollis *et al.*, 1982; Tanuchi *et al.*, 1988; Snipes *et al.*, 1992) cuyos productos pueden ser neurotrofinas, moléculas con efectos estimulantes en el desarrollo y la supervivencia neuronal, como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y sus receptores de membrana, como el receptor de baja afinidad p75NGFr para el NGF; también expresan moléculas de adhesión, que en base a su localización pueden ser de superficie celular como la L-1, la N-cadherina, la molécula de adhesión celular neural (N-CAM), la glicoproteína asociada a la mielina, o bien proteínas integrales de membrana tipo integrinas cuya actividad receptora facilita la adhesión al sustrato. Además participan

moléculas de la matriz extracelular como las glicoproteínas fibronectina y laminina que son potentes promotores tanto de la adhesión como de la regeneración axonal (Baran *et al.*, 1982; Daniloff *et al.*, 1986; Bandtlow *et al.*, 1987; Martini y Schachner, 1988; Lander, A., 1989; Mirsky y Janssen 1990; Schachner, 1990; Acheson *et al.*, 1991).

Respuesta de los fibroblastos a la lesión del nervio periférico

En condiciones normales los fibroblastos son células grandes, planas, de aspecto fusiforme con extensiones citoplásmicas delgadas y alargadas; el núcleo es oval y elongado pero al entrar en fase mitótica adquieren forma esférica y pierden su capacidad de adherencia (Fawcett, 1994). Los fibroblastos jóvenes son células de sostén sintetizadoras de moléculas precursoras de los componentes que forman la matriz extracelular, tienen un citoplasma relativamente homogéneo, basófilo por la elevada concentración de retículo endoplásmico rugoso donde se sintetizan los polipéptidos precursoras de moléculas como colágena, elastina, proteoglicanos (ácido hialurónico, dermatan sulfato, etc.) y glicoproteínas (fibronectina, laminina, entactina, etc.), las cuales constituyen la base de la organización espacial y el sostén mecánico en todos los tejidos del organismo (Weiss, 1988; Alberts *et al.*, 1994). Al llegar a su estado de madurez se les suele denominar fibroctos, son relativamente inactivos y su citoplasma es débilmente basófilo por tener poco retículo endoplásmico (Ham y Cornack, 1984).

Cuando el tejido sufre alguna lesión, aparte de la reacción inflamatoria inicial, se presentan una serie de respuestas humorales, celulares, vasculares y neurales que disparan los procesos inmediatos de degeneración y posteriormente los regenerativos, se forma un complejo que involucra células inflamatorias, endoteliales, fibroblastos, capilares nuevos, glicoproteínas y proteoglicanos que reciben el nombre de tejido de granulación; las principales células implicadas en los eventos de regeneración tisular son los pericitos de las paredes de los vasos sanguíneos y los fibroblastos (Weiss, 1988; Ross *et al.*, 1992; Ham y Cornack, 1984).

Los fibroblastos muestran una respuesta desde el inicio de la reacción inflamatoria y, al igual que los leucocitos, responden a moléculas activadoras o mediadores inflamatorios, factores quimotácticos y citocinas (moléculas que activan o regulan las actividades de otras células) liberados por diversas células. En consecuencia, muestran quimotactismo, desarrollan una alta actividad secretora y de proliferación celular (Stevens y Lowe, 1993).

Los mecanismos de reparación se inician aún cuando la inflamación esté presente. Mientras las células endoteliales inician la formación de nuevas redes capilares, los fibroblastos empiezan a secretar nuevos compuestos formadores de la matriz extracelular especialmente fibronectina, colágena y proteoglicanos. La fibronectina se puede unir al fibrinógeno y a la fibrina formando redes que pueden funcionar como vías de migración celular durante la regeneración; mientras que la colágena depositada es en gran parte la que restaura la fuerza de la tensión en el tejido dañado. El desarrollo de las cicatrices de colágena está sujeto a remodelación por procesos de reciclaje enzimático y por síntesis de nuevas fibras (Weiss, 1988; Stevens y Lowe, 1993).

Respuesta de los macrófagos a la lesión del nervio periférico

Los macrófagos residentes del SNP representan aproximadamente del 2 al 9% de la población celular endoneural del NP normal (Ardison, 1977). Son células diferenciadas cuyos precursores se originan en la médula ósea. Su desarrollo, diferenciación, fenotipo y estado de activación es regulado por diversas citocinas y factores de crecimiento (péptidos que estimulan el desarrollo, diferenciación y supervivencia en células específicas); a su vez los macrófagos producen citocinas que influyen sobre células inmunológicas y células no neurales del NP (Griffin *et al.*, 1993). Intervienen, además, en diversos procesos biológicos en el nervio del cual forman parte, tanto en condiciones normales como patológicas; participan en los procesos de inflamación, degeneración, regeneración, producción de factores de crecimiento y en la neuroinmunología del SNP (Oldfors, 1980; Schubert y Friede, 1981). Los macrófagos del nervio sin lesión, morfológicamente semejantes a los fibroblastos endoneurales, son células alargadas, ramificadas, orientadas longitudinalmente al eje del nervio, ocasionalmente se encuentran cerca de los vasos sanguíneos, aunque un gran número se ubica intersticialmente en el espacio endoneural (Monaco *et al.*, 1992).

La activación y producción de citocinas por los macrófagos es compleja y depende del evento específico en el cual participen (Griffin *et al.*, 1993). Entre los factores activantes se encuentran el interferón gamma (IFN- γ) y las interleucinas 4 y 10 (IL-4, IL-10). También son importantes los factores de desactivación como el TGF- β que suprime la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-10 que inhibe la traducción de RNAm para el TNF- α y para la IL-1 β (Griffin *et al.*, 1993).

De las citocinas derivadas de los macrófagos las más importantes en el SNP son la IL-1, la IL-12 y el TNF. La IL-1 es de especial importancia ya que promueve la expresión del NGF cuando existen CS que han perdido contacto con los axones (Bogdan *et al.*, 1992).

Fenotípicamente los macrófagos residentes del SNP expresan receptores para el fragmento constante (Fc) de las inmunoglobulinas G, una variedad de antígenos característicos de la línea del sistema fagocito-mononuclear (MPS), como el receptor para el componente 3 (C3) del sistema del complemento (Dijkstra *et al.*, 1985) y muestran una alta expresión de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de las clases I y II (Gehmann y Kreuzberg, 1991) (figura 3). Este tipo de macrófagos del SNP se hallan estratégicamente ubicados para responder rápidamente al daño del nervio y también actúan como las principales células primarias presentadoras de antígenos del SNP, ya que toman y procesan cualquier proteína encontrada dentro del espacio endoneural presentándola a las células T circulantes (Yu *et al.*, 1990; Griffin *et al.*, 1993).

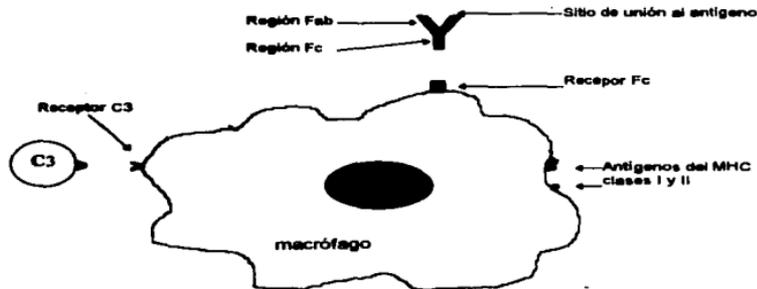


Figura 3. Los macrófagos presentan diferentes moléculas de reconocimiento en su membrana como: los receptores para la región Fc del anticuerpo, el receptor para C3 (componente central del sistema del complemento que participa en la lisis celular mediada por anticuerpos, atrae a las células fagocíticas y aumenta su capacidad para ingerir y destruir microorganismos) y antígenos del MHC (región cromosómica que codifica para antígenos de membrana de reconocimiento tisular) Tomado de Alberts *et al.*, 1994.

En condiciones de lesión del NP, la respuesta de los macrófagos residentes ha sido estudiada tomando fragmentos de nervio y colocándolos en cultivo de tejidos, donde las fibras nerviosas inician los procesos de degeneración, entonces los macrófagos residentes rodean y migran hacia los extremos de los nervios convirtiéndose en células ameboides, aunque muchos retienen su forma elongada (Goodrum y Novicki, 1988).

En un estudio inmunocitoquímico realizado por Monaco *et al.* (1992), usando diferentes anticuerpos monoclonales para estudiar macrófagos residentes del NP en condiciones normales y de lesión, encontraron que después de la lesión del nervio, todos los macrófagos presentan una expresión diferencial de marcadores inmunológicos, lo cual está relacionado con diferentes estados de activación y con la heterogeneidad celular de los macrófagos presentes en el sitio del trauma.

Los cambios lentos tanto morfológicos como fisiológicos de los macrófagos residentes contrastan con los cambios rápidos de las células cebadas las cuales en respuesta a la axotomía contribuyen al rompimiento de la barrera hemato-nerviosa y a la producción del edema endoneural característico de los nervios degenerados (Dijkstra *et al.*, 1985; Yu *et al.*, 1990).

Después de la lesión del nervio, durante la DW, la señal inicial para el reclutamiento y activación de macrófagos parece depender de la degeneración de los axones más que del propio efecto de la axotomía del extremo distal del NP (Lunn *et al.*, 1989).

Los macrófagos que arriban al sitio del trauma provienen tanto de los residentes del NP como del reclutamiento de monocitos de la circulación sanguínea, que en esta etapa realizan actividades que incluyen la fagocitosis de los restos de la mielina degenerada, la producción de factores mitogénicos para CS y fibroblastos, así como la liberación de factores de crecimiento neural (Baichwal *et al.*, 1988; Stoll *et al.*, 1989; Perry y Brown, 1992); también producen proteínas asociadas con la regeneración como la proteína E que permite que las CS tomen y reciclen el colesterol liberado por la degradación de mielina, lo que es importante ya que el colesterol es requerido por las CS para la remielinización de ramificaciones nerviosas durante la regeneración (Goodrum y Novicki, 1988; Boyles *et al.*, 1989). La eliminación de los restos tisulares no excluye la participación de las CS, ya que en ausencia de macrófagos estas células pueden tomar y eliminar los residuos de mielina (Beuche y Friede, 1984).

La activación de macrófagos residentes del NP se lleva a cabo en casi cualquier tipo de enfermedad que involucre pérdida de axones, pérdida de mielina o ambas, donde los

leucocitos polimorfonucleares o los linfocitos no son requeridos. Los macrófagos circulantes participan activamente en procesos que no requieren mediación inmunológica (Griffin *et al.*, 1993). La facilidad con la cual los monocitos circulantes entran al SNP es la principal razón por la cual los cambios en las células residentes en condiciones de patología no han llegado a ser esclarecidas, debido a que los macrófagos no residentes invaden la zona de lesión y actualmente no existen marcadores fenotípicos que puedan distinguir macrófagos circulantes de macrófagos residentes en actividad ya que los marcadores inmunológicos anti-rata existentes hasta la fecha para monocitos y macrófagos son expresados en ambos tipos celulares. (Monaco *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1993).

ANTECEDENTES SOBRE ESTUDIOS DE LESION EN NERVIJO PERIFERICO

En estudios recientes se ha demostrado que los implantes del muñón distal de un nervio periférico prelesionado (NPP), es decir lesionado con anterioridad a su utilización, contribuyen a una mejor reparación del tejido receptor a diferencia de los realizados a partir de implantes de nervio periférico fresco, debido al mayor número de CS presentes en el primero y, por consiguiente, a la mayor producción de una gran variedad de factores y componentes de la lámina basal que estimulan el crecimiento axonal, porque cuando esta última ha sido modificada por la lesión sirve como sustrato para las fibras nerviosas en regeneración (Heumann *et al.*, 1987; Rutka *et al.*, 1988; Danielsen *et al.*, 1994). También se ha demostrado que el uso de injertos de NPP contribuye significativamente en la sobrevida de neuronas axotomizadas del sistema nervioso central (SNC), gracias a que las CS que han sido activadas por la lesión del nervio contribuyen a la sobrevida y recrecimiento axonal (Daniloff *et al.*, 1986; Martini y Schachner, 1988; Bahr *et al.*, 1992). Otra ventaja que ofrece la presencia de las CS es que, al igual que los oligodendrocitos, no están limitadas en cuanto a su capacidad mielinizante, ya que ambos pueden mielinar axones tanto del SNP (Aguayo *et al.*, 1978) como del SNC (Blakemore, 1977).

Para que un NPP sea usado como tejido de transplante es importante conocer el tiempo óptimo de degeneración previa en el cual las CS llegan a su máxima proliferación, para lograr una mejor remielinización del tejido receptor; así como el momento en el que existe una gran cantidad de macrófagos para que limpien la zona de lesión de los restos axonales y mielínicos que pueden interferir con el recrecimiento axonal y la etapa donde la cantidad de fibroblastos sea mínima para evitar la fibrosis en la zona del implante. Sin embargo, en la literatura existe controversia sobre el momento en el que cada tipo celular alcanza su máxima población después de una lesión de un NP (tabla 1).

TABLA 1. Tiempos reportados por diferentes autores en los cuales las células de Schwann (CS), los fibroblastos (FIB) y los macrófagos (MAC) alcanzan su máxima población después de la lesión del nervio ciático.

AUTOR	MODELO ANIMAL ESTUDIADO. PESO/EDAD	TTE	MARCADORES Y TECNICAS PARA IDENTIFICACIÓN	TECNICA DE CONTEO	CS (tmp)	FIB (tmp)	MAC (tmp)
MIYAMOTO <i>et al.</i> , 1986	NC de rata Wistar macho. 250 g	1-12 m	Criterios en base a la morfología celular	Conteo del Area Total	1 m	6 m	1 m
PERRY <i>et al.</i> , 1987	NC de rata Long-Evans y ratón CBA/J y BALB/c. Adultos	0.5-21 d	OX1 y OX30 para macrófagos	—	—	—	3-5 d
SALONEN <i>et al.</i> , 1988	NC de rata Wistar, hembra. Adultos	1-30 s	Anti-S:100 para CS; antitripsina-1- α para macrófagos	Conteo del Area Total	4 s	4 s	1 s
CLEMENCE <i>et al.</i> , 1989	NC de rata Sprague Dawley. 150g	1-8 d	Anti-S:100 y Anti-P, para CS; ED1 para macrófagos. Cultivo de tejidos Autoradiografía	Conteo del Area Total	3 d	—	2 d
KOMIYAMA y SUZUKI, 1992	NC de ratón C3HeB/Fej, de 3d, 6d y 60d	1-7 d	Anti-S:100, anti-GalC y anti-MBP para CS; anti-fibronectina para fibroblastos y MAC-1 para macrófagos Cultivo de tejidos Autoradiografía	Porcentaje	3 d	—	—
SIIRONEN <i>et al.</i> , 1992	NC de rata Wistar macho. 10-12 s	3-56 d	Anti-S:100 para CS; Anti-PCNA para células proliferantes y ED1 para macrófagos	Conteo del Area Total	14 d	—	—
AVELLINO <i>et al.</i> , 1995	NC de rata Lewis, macho. 200-300g	4 hr-35 d	ED1 para macrófagos	Conteo por Area de 0.1mm ²	—	—	21 d

TTE = tiempo total de estudio

NC = nervio ciático

tmp = tiempo de población máxima

d = días, s = semanas, m = meses

El pico máximo de proliferación para CS según diferentes autores puede alcanzarse entre el tercer día y las diez semanas postlesión; para los macrófagos el pico máximo de reclutamiento se alcanza entre el tercer día y las seis semanas y para los fibroblastos el pico máximo de proliferación está entre las seis semanas y los seis meses después de la lesión (Miyamoto *et al.*, 1986; Perry *et al.*, 1987.; Salonen *et al.*, 1988; Clemence *et al.*, 1989; Komiyama y Suzuki, 1992; Sironen *et al.*, 1992; Avellino *et al.*, 1995).

Marcadores inmunológicos para células de Schwann, macrófagos y fibroblastos

La cuantificación comparativa de CS, macrófagos y fibroblastos en NP normal y lesionado, se ha realizado empleando diferentes metodologías, entre las que se incluyen el estudio histológico en microscopía de luz y en microscopía electrónica.

Bajo condiciones de lesión del NP la distinción entre CS y fibroblastos se hace difícil debido a la pérdida de sus características distintivas; Young (1949), hizo un estudio en el cual la identificación entre ambos tipos celulares la basó en su forma de crecimiento, ya que en cortes longitudinales las CS son elongadas y proliferan formando columnas de varias células de grosor rodeadas por una membrana basal común (Thomas, 1966), características que también muestran las CS en cultivo; en cambio los fibroblastos presentan una separación entre uno y otro por la colágena depositada aún cuando lleguen a tener arreglos columnares. Denny-Brown (1946) hizo su identificación sólo por las diferencias morfológicas de los núcleos celulares. Sin embargo, estas técnicas generan resultados subjetivos y de apreciación de muy difícil interpretación, especialmente en condiciones de lesión. En la actualidad las técnicas inmunohistoquímicas son las más utilizadas y aceptadas para la diferenciación de estos tipos celulares en condiciones de lesión.

Las CS pueden ser identificadas mediante el uso de anticuerpos como el anti-S:100 (Brookes *et al.*, 1977; Salonen *et al.*, 1988); el anti-NGF; el anti-CGRP (Reynolds y Woolf 1992); el marcador Ran-1 (Brookes *et al.*, 1977) y el empleo de lectinas como el PNA o lectina de cacahuete (Corbo *et al.*, 1993).

Los fibroblastos pueden ser identificados mediante anticuerpos como el HIS43 (Hemans *et al.*, 1989) y el Thy-1.1 (Brookes *et al.*, 1977).

Para macrófagos de rata se han empleado técnicas de histoquímica enzimática, como es el caso de la esterasa inespecífica (Pearse, 1972), los anticuerpos ED1 y ED2, siendo este último un marcador muy sensible (Griffin *et al.*, 1993); los anticuerpos MUC 101 y MUC 102.

que reconocen proteínas de microglía de rata; el anticuerpo monoclonal OX-42 para el receptor C3 del complemento (Monaco *et al.*, 1992).

Para el desarrollo del presente trabajo se empleó el anticuerpo policlonal anti-S:100 para la identificación de células de Schwann y el anticuerpo monoclonal HIS43 para la identificación de fibroblastos. La detección de macrófagos se realizó por histoquímica enzimática.

El anticuerpo policlonal anti-S:100, tiene afinidad por la proteína S:100, la cual está relacionada con el metabolismo del calcio (Brockes *et al.*, 1977). Actualmente es reconocida como un factor neurotrófico (Cummings y Brunjes, 1995) que se encuentra concentrada al menos 10,000 veces más en cerebro que en algún otro de los tejidos en donde está presente (Moore, 1965). Existe bajo tres formas diméricas que comprenden las subunidades α y β . *In vitro* se ha demostrado que la subunidad β , encontrada normalmente en astroglia y CS, estimula la extensión neural y la proliferación de la glía (Kilgman y Hill, 1988; Selinfreund *et al.*, 1991).

El anticuerpo monoclonal HIS43 es una IgG de ratón contra endotelio sinusoidal de rata, que en la inmunohistoquímica por congelación presenta inmunorreacción específica para fibroblastos, fibrocitos, células de músculo liso y células endoteliales de vasos sanguíneos (Hermans *et al.*, 1989).

En el caso de macrófagos y otros tipos celulares como las células de Langerhans pueden ser identificados a través de métodos de histoquímica enzimática con base a la capacidad de sus esterasas de hidrolizar el ácido carboxílico (Robinson *et al.*, 1990). Debido a que la mayoría de las esterasas son de acción hidrolítica y sintética, si un éster simple como el metil butirato o el α -naftil acetato es su sustrato, entonces la enzima se clasifica como esterasa no específica (Pearse, 1972). Del método inicial para esterasa no-específica usando el α -naftil acetato como sustrato, Gomori (1952) hizo modificaciones posteriores utilizando el mínimo de acetona como diluyente, encontrando varios sitios de actividad de esterasa marcados positivamente por la incubación breve con este sustrato, seguida de un enjuague y el acoplamiento con la sal pararosanilina hexazotizada, que además de aumentar la efectividad de la reacción tiene un efecto metacromático.

JUSTIFICACION

Tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico dañados se han realizado implantes de nervio periférico con el objeto de regenerar el tejido lesionado; sin embargo, el éxito del trasplante depende de múltiples factores. Recientemente se ha demostrado que las células activadas de nervios prelesionados, como las células de Schwann y los macrófagos, que se utilizan como trasplante condicionado influyen en la restauración del tejido receptor y contribuyen en la sobrevida al proveerle de un sustrato favorable caracterizado por una mayor cantidad de moléculas promotoras de procesos regenerativos, entre las que se encuentran factores de crecimiento (FGF, NGF, GGF, PDGF) y moléculas provenientes de la membrana basal (fibronectina, laminina y moléculas de adhesión), así como la función regenerativa de tales células.

Por lo anterior, la identificación y cuantificación de los principales tipos celulares que proliferan y migran a diferentes tiempos después de una lesión del nervio periférico permitirán su mejor utilización como trasplante condicionado en futuros trabajos de regeneración de tejido nervioso.

PROBLEMA

Existe controversia entre diferentes autores sobre el momento en el cual las células de Schwann, fibroblastos y macrófagos alcanzan su pico máximo de proliferación o reclutamiento después de una lesión del nervio periférico, por lo que se desconoce el tiempo óptimo de predegeneración que requiere un nervio periférico para ser usado como tejido de trasplante.

HIPOTESIS

En el nervio periférico, después de una lesión por sección completa, se presentará una respuesta de proliferación y migración celular a diferentes tiempos entre células de Schwann, macrófagos y fibroblastos.

OBJETIVO

Cuantificar las poblaciones de células de Schwann, macrófagos y fibroblastos después de una lesión de nervio ciático para determinar el momento en el cual cada tipo celular alcanza su pico máximo de proliferación o reclutamiento con el fin de utilizar este tejido en futuros trabajos como trasplante condicionado.

METODOLOGIA

i) Grupos control, maniebra y experimental.

Se utilizaron 24 ratas de la cepa Long Evans, hembras, adultas, entre 12 y 14 semanas de edad con peso corporal de 230 a 250 g, divididas en tres grupos:

Grupo control: formado por 4 ratas a las cuales no se les hizo ningún tipo de lesión y la muestra del muñón distal se obtuvo a 3, 7, 30 y 60 días, de acuerdo a los periodos de los grupos experimentales.

Grupo de maniebra experimental: formado por 4 ratas a las cuales se les aplicó el mismo procedimiento quirúrgico y periodos de evolución que al grupo experimental excepto el procedimiento de sección transversal de la rama peroneal del nervio ciático.

Grupo experimental: formado por 16 ratas, que a su vez se dividieron en 4 subgrupos a los cuales se les efectuó una lesión mediante sección transversal de la rama peroneal del nervio ciático en ambos miembros posteriores. Los animales fueron sometidos a una segunda cirugía para la obtención del muñón distal del nervio a 3, 7, 30 y 60 días después de la sección.

ii) Lesión del nervio ciático

Los animales se anestesiaron via intramuscular con una mezcla de 77.5 mg de ketamina (clave 226, Sector Salud) y 12.5 mg de hidrocioruro de xilacina (Lab. Bayer, Alemania) por kg de peso corporal.

Después de anestesar al animal y realizar la asepsia de la zona quirúrgica se hizo una incisión en la piel a nivel de la región lateral superior y posterior del muslo y se separaron los músculos hasta que quedó expuesto el NC. A partir de la bifurcación del nervio en sus ramas tibial y peroneal se disecó aproximadamente un centímetro de su rama peroneal y aproximadamente a 4 mm a partir de la bifurcación se pasó una sutura 6-0 (Polypropylene deknate) a través del epineuro y otra a los 8 mm de la primera. Posteriormente se hizo un corte transversal completo de esta rama del nervio entre las dos suturas, el extremo proximal se dobló completamente y se fijó sobre su mismo epineuro, mientras que el extremo distal se dobló en un ángulo mayor de 90° y se fijó a la aponeurosis del músculo adyacente (*vastus lateralis*). Finalmente se procedió a cerrar por planos con sutura 5-0 (Nylon monofilamento). Esta operación se repitió en la otra extremidad posterior de cada rata. Después de la cirugía los animales se mantuvieron en observación a una temperatura de 25°C en jaulas individuales, con una dieta a base de alimento comercial y agua a libre demanda.

III) Procesamiento del tejido

Una vez cumplido el plazo de estudio de cada grupo experimental, los animales fueron sometidos a una segunda cirugía para la obtención de las muestras del nervio periférico prelesionado (NPP), para lo cual se hizo una resección de la zona de lesión y se extrajeron aproximadamente 10 mm del muñón distal del nervio. Un total de 24 muestras de NPP se fijaron en formaldehído al 10% para su posterior procesamiento con inmunohistoquímica mediante la técnica ABP (Coggi *et al.*, 1986; Bancroft, 1990) con el anticuerpo policlonal anti-S:100 (producto no. S-2532 Sigma Immunochemicals), para la identificación de células de Schwann. Otras 24 muestras de NPP se colocaron en una solución de sacarosa al 30% a 4°C durante una hora, posteriormente se incluyeron en el crioprotector OCT (optimal cutting temperature embedding medium) y se congelaron a -70°C hasta que fueron cortados por congelación para la demostración histoquímica de la enzima esterasa inespecífica para la localización de macrófagos y por inmunohistoquímica mediante la técnica ABP (Coggi *et al.*, 1986) con el anticuerpo HIS43 (Mouse anti-endothelium smooth muscle and fibroblast, Serotec Labs.), para la identificación de fibroblastos (figura 4).

Antes del procesamiento inmunohistoquímico, se llevó a cabo la técnica histológica de control hematoxilina-eosina, H-E, (Stevens, 1990) para la observación del tejido. En el procedimiento inmunohistoquímico se hizo un control negativo para cada grupo experimental, el cual consistió en llevar a cabo la técnica omitiendo el anticuerpo primario.

Técnica inmunohistoquímica por el Método Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa.

a) Identificación de Células de Schwann con el anticuerpo anti-S100

Ya fijada la muestra en formaldehído al 10%, se procedió a la deshidratación del tejido de acuerdo a los siguientes pasos:

SOLUCIÓN	TIEMPO (hr)
Alcohol 50°	1.5
Alcohol 80°	1.5
Alcohol 96°	1.5
Alcohol 100°	1.5
Xilol	1.5
Parafina	1.5

Cada paso se repitió dos veces

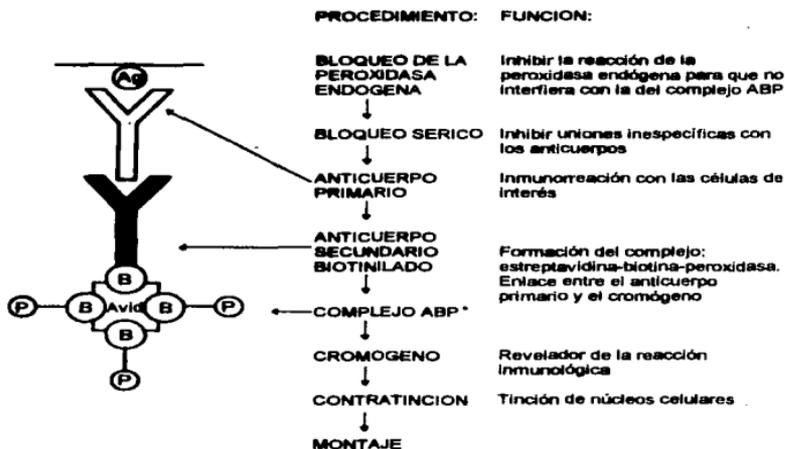


Figura 4. Descripción esquemática del Método Inmunohistoquímico Avidina-Biotina-Peroxidasa. (Tomado de Coggi *et al.*, 1986 y Bancroft, 1990).

• La avidina se puede reemplazar por la estreptavidina la cual tiene una mayor afinidad por la biotina.

El tejido se incluyó en parafina a 60° C y se hicieron los cortes en el microtomo con un grosor de 5 µm, se colocaron en los portaobjetos tratados con poli-L-lisina al 0.1% y se dejaron secar por 10 min.

Siguiendo el esquema general de la técnica ABP (Coggi *et al.*, 1986; Bancroft, 1990), se llevaron a cabo los siguientes pasos en cada corte:

1. Se bloqueó la peroxidasa endógena sumergiendo las laminillas en una solución, 1:9, de H₂O₂ al 30% y metanol absoluto.
2. En cada corte se colocaron dos gotas de albúmina sérica bovina al 1% más tritón al 0.01%, en proporción 1:100, en PBS (amortiguador salino de fosfatos, 10 mM, pH 7.5) por 10 min.
3. Se agregó el antisuero anti-S100 en una dilución 1:100, por 24 hr a 4° C; lavándose después con PBS.
4. Se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) biotinilado por 10 min. y se lavó después con PBS.
5. Se incubó en el complejo estreptavidina-peroxidasa por 10 min, lavando después con PBS.
6. Se reveló con amino-etil-carbazol por 5 min., lavando después con PBS.
7. Se contrastó con hematoxilina de Harris durante 10 min, lavando posteriormente con PBS.
8. Finalmente se hizo el montaje en alcohol polivinílico (Plenat *et al.*, 1994).

b) Identificación de Fibroblastos con el anticuerpo HIS43

Los cortes se hicieron por congelación con un grosor de 8 µm, se colocaron en el portaobjetos adhiriéndolos con poli-L-lisina al 0.1% y se dejaron secar por 10 min.

Después se llevaron a cabo los siguientes pasos en cada corte:

1. Se fijaron en acetona absoluta durante 10 min.
2. Se sumergieron en una solución PBS (amortiguador salino de fosfatos, 10 mM, pH 7.5) durante 10 min.
2. Se agregó ácido periódico al 0.28%, como bloqueador de la peroxidasa endógena, durante 30 segundos.
3. Se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% más tritón al 0.01%, 1:100, en PBS por 10 min.
4. Se agregó el anticuerpo HIS43 en una dilución 1:500 por 24 hr a 18° C; lavándose después con PBS.
5. Se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) biotinilado por 10 min., lavándose después con PBS.
6. Se agregó la estreptavidina-peroxidasa por 10 min., lavándose después con PBS.

7. Se reveló con amino-etil-carbazol por 5 min., lavando después con PBS.
8. Se contrastó con hematoxilina de Harris por 10 min., lavando posteriormente con PBS.
9. Finalmente se hizo el montaje con alcohol polivinílico (Plenat *et al.*, 1994).

Demonstración histoquímica de la enzima esterasa inespecífica, para la identificación de macrófagos.

Los cortes fueron hechos por congelación y se siguió el esquema general para la demostración enzimática de la esterasa inespecífica (Bancroft, 1990). Se realizaron los siguientes pasos en cada corte:

1. Se fijaron los cortes en acetona absoluta por 10 minutos a temperatura ambiente. Dejándose secar 10 min.
2. Se rehidrataron en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7, durante 10 min.
3. Se incubaron en el medio de reacción para la esterasa inespecífica* por 20 min.
4. Se lavaron en agua destilada.
5. Se hizo la contraincubación con hematoxilina de Mayer.
6. Se montaron en gelatina glicerinada (Plenat *et al.*, 1994).

*Preparación del medio de incubación para la demostración histoquímica de la enzima esterasa inespecífica.

Se mezclan perfectamente las 3 soluciones siguientes:

- 1) 5 mg de α -naftil acetato en 0.2 ml de acetona.
- 2) 1.2 ml de pararosanilina hexazotizada.
- 3) 20 ml de amortiguador de fosfatos (2.83 g de Na_2HPO_4 en 100 ml de agua destilada), 0.1 M, pH 7.

La preparación de la pararosanilina hexazotizada requiere de dos soluciones:

Solución A: se disuelve 0.1 g de pararosanilina en 0.5 ml de HCl, posteriormente se diluye en 20 ml de agua destilada, se calienta suavemente para disolver, se enfría, se filtra y se guarda a 4° C.

Solución B: se disuelve 0.048 g de nitrato de sodio en 1.2 ml de agua destilada, para obtener una solución acuosa al 4%.

Para la mezcla final se tomaron 0.6 ml de la solución A, más 0.6 ml de la solución B en 20 ml del amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.

iv) Método Cuantitativo

El conteo se llevó a cabo sobre el área total del corte transversal del nervio, basándose en el método modificado del Disector (Sterio, 1984); tomando en cuenta los siguientes criterios, para la asignación de una reacción positiva en cada célula:

1. Observación de la reacción inmunopositiva o enzimática positiva.
2. Presencia del núcleo celular.
3. Presencia de citoplasma.

La cuantificación celular se hizo en un fotomicroscopio Zeiss a un aumento de 400x (figura 5).

CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

Para los grupos control, maniobra y experimental se incluyeron las ratas que cumplieron con los requisitos de edad, sexo y peso corporal previamente establecidos. Para el grupo experimental se excluyeron aquellos animales en los que después de la lesión del nervio los extremos de éste se llegaron a unir espontáneamente así como las ratas con alguna patología posterior a la cirugía como infección o autofagia en la zona de lesión.

CONSIDERACIONES ETICAS

El presente estudio siguió los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título Séptimo: de la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación), publicada en 1990.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se hizo mediante el programa de cómputo Sigma Stat para Windows, ver. 1.0, copyright 1992-1994, Jandel Co.

Mediante estadística descriptiva se obtuvieron los porcentajes, promedios, medias y error estándar para cada una de las poblaciones celulares estudiadas en cada uno de los grupos control, maniobra y experimental.

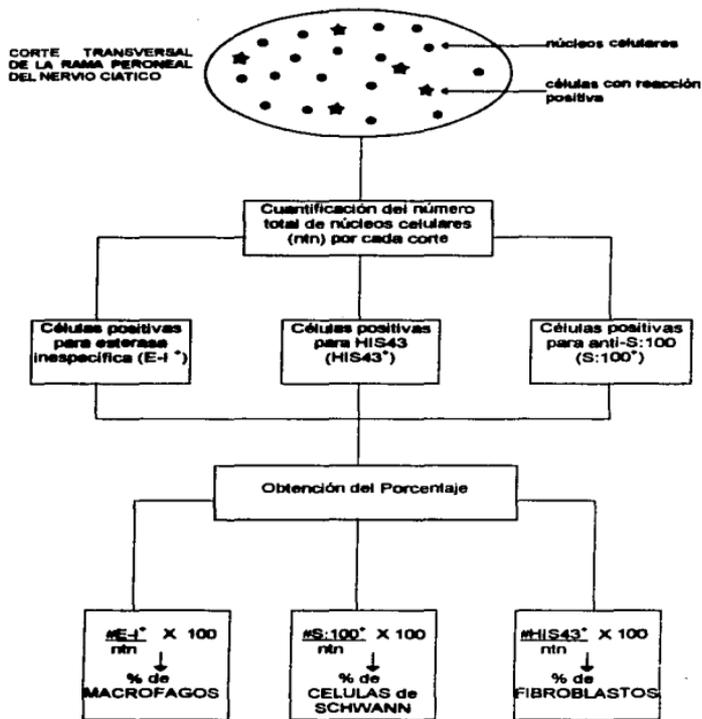


Figura 5. Esquema del análisis cuantitativo de las diferentes poblaciones celulares, estudiadas en la rama peroneal del nervio ciático.

La significancia estadística en los diferentes grupos, se evaluó contrastando los resultados a cada uno de los diferentes tiempos de estudio de las poblaciones de células de Schwann, fibroblastos y macrófagos por separado, aplicando las siguientes pruebas de estadística analítica:

Para la población de células de Schwann cuyos datos tuvieron una distribución normal, se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía; para identificar al o a los grupos que generaron diferencia estadística se aplicó la prueba de Dunnett.

Para las poblaciones tanto de macrófagos como de fibroblastos que no presentaron una distribución normal, se aplicó la prueba no-paramétrica de análisis de varianza en rangos Kruskal-Wallis, seguida del procedimiento de comparación múltiple de Dunn.

Se consideró a $P < 0.05$, como valor estadísticamente significativo.

Los resultados de la cuantificación de las diferentes poblaciones celulares expresadas en porcentajes promedio por grupo y su correspondiente error estándar se presentan en tablas y las distribuciones poblacionales en gráficas.

RESULTADOS

I. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

a) Nervio normal y maniebra.

Con las técnicas empleadas se observó en la región más externa del NP la cubierta epineural formada por capas de células alargadas en forma de huso correspondientes a fibroblastos. Las reacciones para la detección de CS y macrófagos resultaron negativas en epineuro. La presencia de la capa perineural no fue evidente con las técnicas utilizadas en este trabajo, mientras que la región endoneural fue más notoria con H-E y con S:100.

La reacción positiva para macrófagos se detectó en baja cantidad, entre las zonas intersticiales de las fibras nerviosas (figura 6a).

Al interior del endoneuro se observó la capa de mielina formada por las CS con una zona acidófila central correspondiente a la fibra axónica; hacia la periferia limitando con la zona endoneural se presentó su núcleo grande, cóncavo y basófilo (figura 7a).

De forma similar que para macrófagos, las células positivas al HIS43 correspondientes a fibroblastos se presentaron en zonas intercelulares. (figura 8a).

En cuanto a la vascularización, generalmente se observó un vaso sanguíneo principal central o excéntrico de mayor calibre y en promedio otros 8 de menor tamaño, aproximadamente de 2 a 4 veces el diámetro de las fibras mielinizadas. No se observaron vasos sanguíneos a nivel epineural.

b) Nervio periférico de 3 días de lesión.

A los tres días de la lesión se manifestó una pérdida inicial de la citoarquitectura así como de la estructura general del nervio y se presentaron algunos restos de tejido degenerante en toda el área del NP. También se iniciaron los eventos de proliferación y el reclutamiento celular evidenciados por el aumento de fibroblastos y macrófagos.

Los macrófagos, esterase inespecífica positivos, se caracterizaron por presentar un tamaño mayor que en el NP normal; en esta etapa la actividad fagocítica no es tan alta, lo cual se refleja en la baja cantidad de vesículas en su citoplasma.

Muchas de las células inmunorreactivas al anti-S:100 perdieron su morfología normal y algunas presentaron vesículas citoplásmicas que podrían reflejar una incipiente actividad fagocítica.

Los fibroblastos o células positivas al anticuerpo HIS43 aumentaron de tamaño y perdieron su forma alargada, presentando una distribución en toda el área del nervio.

En cuanto a la vascularización se observó un discreto aumento en el calibre de los vasos sanguíneos, dado por el engrosamiento de sus paredes.

Además de las células presentes en el nervio normal se observaron células cebadas, las cuales se identificaron tanto con la técnica de H-E como con la de esterasa inespecífica, por ser células grandes con gránulos intracitoplásmicos de tamaño y distribución homogéneos, llegándose a contar hasta 20 de ellas por corte, presentándose en zonas cercanas a vasos sanguíneos.

c) Nervio Periférico a 7 Días de Lesión

A los siete días continuó el aumento en las diferentes poblaciones celulares, los núcleos celulares se hicieron más grandes y menos basófilos, continuó la pérdida de la estructura normal del nervio. Con base a una mayor cantidad de fibroblastos, se observó un incremento en el tejido conjuntivo del epineuro.

Se observó un gran incremento en el número de células positivas a la esterasa inespecífica (figura 8b) que presentaron una amplia distribución en todo el nervio, aunque con zonas de acumulación correspondientes a los vasos sanguíneos, siendo notoria la modificación en su morfología ya que predominaron los llamados macrófagos espumosos (foam cells), cuya marcada actividad fagocítica es evidente por la presencia de restos de tejido en su interior y la formación de vesículas fagocíticas.

Las CS presentaron una morfología totalmente diferente de la normal, mostrando un incremento en su tamaño total, muchas de ellas mostraron grandes vesículas fagocíticas.

Las células positivas al anticuerpo HIS43 perdieron del todo su forma de huso y la de su núcleo alargado, presentando una distribución mayor en la zona epineural.

El incremento en el diámetro de los vasos sanguíneos así como en el grosor de los endotelios fue más evidente. Las células cebadas permanecieron en una cantidad similar a la etapa de tres días y se observaron células en degranulación.

d) Nervio periférico a 1 mes de lesión

Un mes después de la lesión se mantuvo el incremento en las poblaciones celulares. Los núcleos fueron menos grandes que en las células de la etapa anterior, hubo un engrosamiento del tejido conjuntivo epineural.

Se observó una disminución en el número de células positivas a la reacción de la esterasa inespecífica pero conservaron su distribución en todo el nervio presentando un aspecto que sugiere un incremento en su actividad fagocítica por la presencia de grandes y numerosas vesículas citoplásmicas.

Muchas CS mantuvieron las vesículas fagocíticas y se incrementó el número de células anti-S:100 positivas (figura 7b).

Los fibroblastos no recuperaron su forma de huso y presentaron una mayor distribución en la zona epineural, donde contribuyeron al grosor del epineuro.

Los vasos sanguíneos conservaron sus diámetros mayores que los normales así como el incremento en el grosor de los endotelios y se observó una mayor proliferación vascular intraneural. El número de células cebadas disminuyó marcadamente en esta etapa.

e) Nervio periférico a 2 meses de lesión

A los dos meses se observó una disminución en las poblaciones celulares, con excepción de los fibroblastos, observándose un ligero aumento en el tejido conjuntivo epineural.

Las células positivas a la esterasa inespecífica disminuyeron drásticamente y fue notable el cambio en su morfología. En general las vesículas fagocíticas estuvieron ausentes y conservaron un ligero aumento en su tamaño.

Las CS recuperaron, en gran parte, la morfología normal y prácticamente no se observaron células de Schwann con actividad fagocítica.

Las células positivas al anticuerpo HIS43 continuaron incrementándose, conservaron el aumento en su tamaño sin recuperar su morfología normal (figura 8b).

Aparecieron grandes vasos sanguíneos sobre el epineuro y disminuyó el número de los vasos intraneurales. Las células cebadas, aunque en baja cantidad, continuaron presentes.

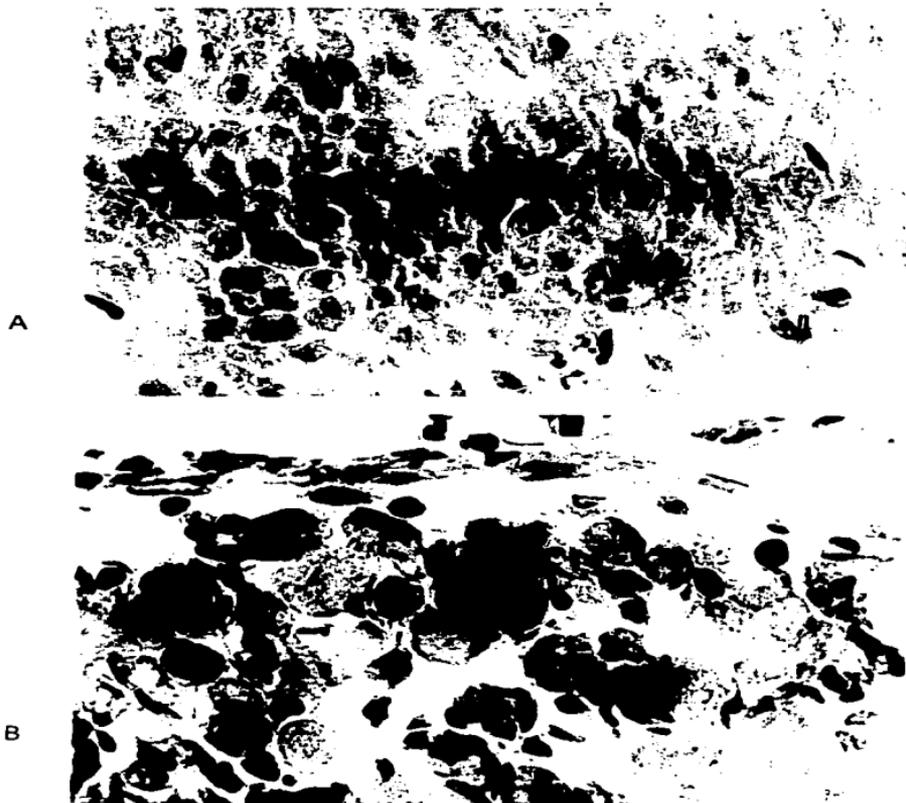


Figura 6. Fotografía del corte transversal de la rama peroneal del nervio ciático. Técnica: Histoquímica enzimática/Esterasa inespecífica, para identificación de macrófagos. 800x.

A) Nervio normal: en el tejido normal se observan células débilmente positivas a la reacción de la esterasa inespecífica (→); son evidentes los núcleos celulares (n) y su distribución homogénea en el tejido.

B) Nervio lesionado a 7 días: se observa la pérdida de la arquitectura normal del tejido y el mayor número de células positivas a la reacción de la esterasa inespecífica (→); las cuales presentan grandes vesículas fagocíticas (vf) asociadas a células degenerantes (cd).

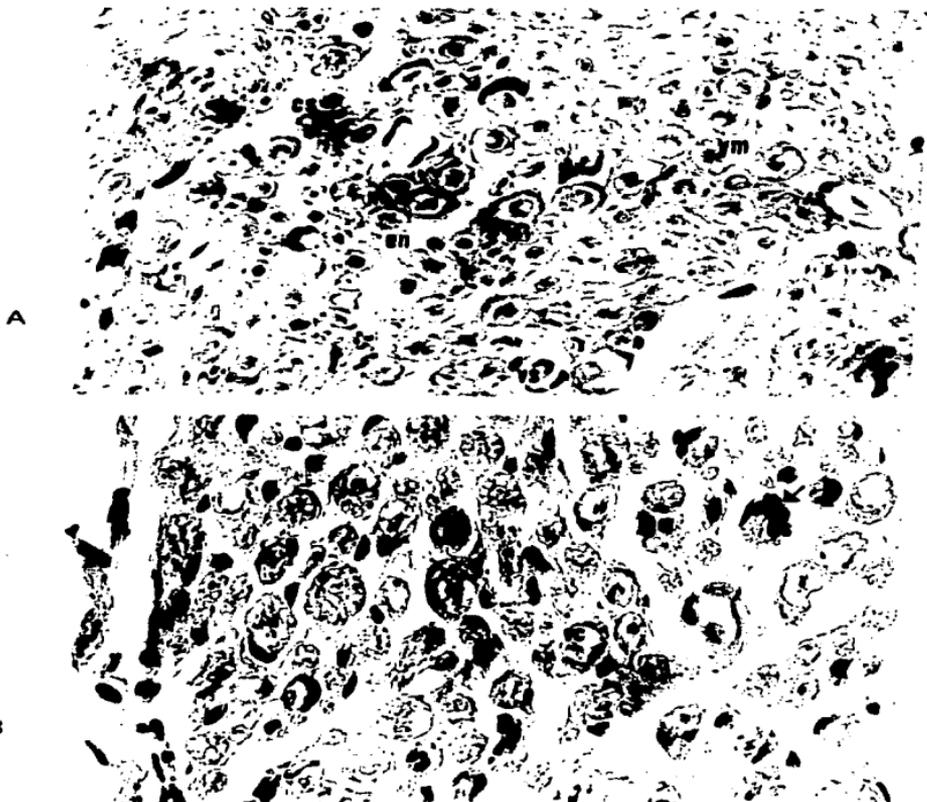


Figura 7. Fotografía del corte transversal de la rama peroneal del nervio ciático. Técnica: ABP/anti-S:100, para identificación de células de Schwann. 800x.

A) Nervio normal: se observan las fibras nerviosas constituidas por el axón (a), rodeado por su vaina de mielina (vm) formada por la célula de Schwann (CS). En el límite externo de la vaina, que está en contacto con el endoneuro (en), se presentan los núcleos de las CS (n) y se observan zonas inmunoreactivas a S:100 (→). En los espacios endoneurales se observan también vasos sanguíneos (vs) de pequeño calibre.

B) Nervio lesionado a 30 días: las células S:100 positivas (→), correspondientes a células de Schwann (CS), alcanzaron su máxima población, muchas presentan vesículas citoplásmicas (vc) que reflejan su actividad fagocítica.

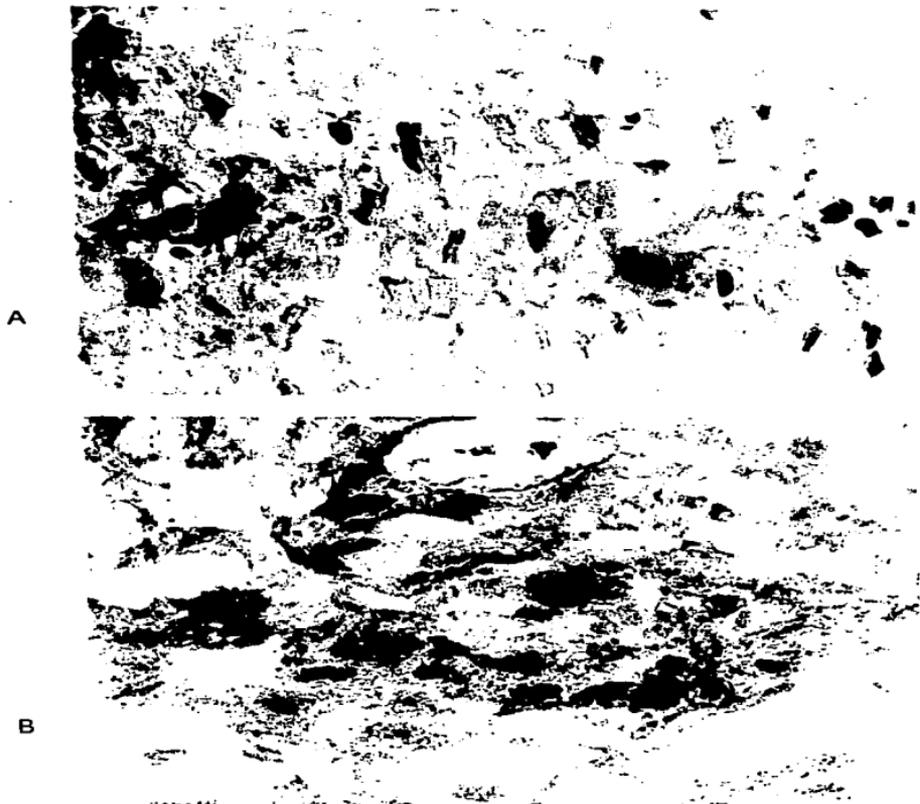


Figura 8. Fotografía del corte transversal de la rama peroneal del nervio ciático. Técnica: ABP/HIS43, para identificación de fibroblastos. 800x.

A) Nervio normal: Las células inmunoreactivas a HIS43 (—), correspondientes a fibroblastos, se presentan en baja proporción en la región intraneural, siendo más abundantes en la zona epineural o cerca de ella.

B) Nervio lesionado a 60 días: Se presenta la mayor población de células positivas para HIS43 (—), no presentan su morfología característica y han aumentado en tamaño.

N. DESCRIPCION CUANTITATIVA

En las tablas 2, 3 y 4 se muestran los porcentajes obtenidos al hacer la cuantificación de macrófagos, CS y fibroblastos, respectivamente, en los grupos control, maniobra y experimental, con respecto a la población celular del área total del nervio.

Al efectuar el análisis estadístico, se encontró que las poblaciones de los grupos control y maniobra no presentaron diferencias significativas entre ambas, lo cual refleja que el procedimiento de maniobra en sí no altera la respuesta migratoria o proliferativa en las poblaciones intraneurales estudiadas (figuras 9, 10, 11).

Al expresar los resultados en porcentajes parece que existe una disminución en algunas poblaciones celulares después de la sección de la rama peroneal del nervio ciático; sin embargo, en su crecimiento absoluto estas poblaciones tienen un incremento posterior a la lesión. Además existe un aumento en otros tipos celulares, particularmente en los periodos correspondientes a tres y siete días, como células cebadas y del endotelio, que no fueron incluidos en el presente estudio.

La población de macrófagos presentó un incremento con respecto a los grupos control y maniobra, alcanzando su máxima población con significancia estadística a los siete días de lesión. No obstante que el porcentaje de macrófagos disminuyó a los treinta y sesenta días, la cifra no regresó a los valores de referencia (figura 9).

En la población de CS su pico de máxima proliferación se identificó a los treinta días posteriores a la lesión con significancia estadística al compararlo con el control y el maniobra. A los sesenta días se observó una significativa disminución en esta población por debajo de la referida en el control (figura 10).

También se observó diferencia estadística en la población de fibroblastos al comparar el grupo control con el grupo experimental. Los fibroblastos mostraron un incremento importante a los treinta días de la sección del nervio (figura 11), sin embargo, su máxima población se observó a los sesenta días, la cual presentó significancia estadística al compararla con la de los grupos control y maniobra.

En la figura 12 se observa el comportamiento comparativo de las tres poblaciones celulares representado en una sola gráfica, donde se aprecian los periodos en que cada una alcanza su pico máximo, observándose la secuencia temporal y el porcentaje de las mismas.

En el tiempo correspondiente a los tres días la población mayor es la de CS con el 18.9%, a pesar de que ha descendido con respecto a su porcentaje normal; la más baja es la de macrófagos con el 4.4% que aumenta al doble con respecto al control, quedando intermedia la de fibroblastos con el 10.3%. A los siete días, cuando los macrófagos llegan a su pico máximo con el 25.3%, las CS tienen otro ligero decremento, mientras que los fibroblastos se muestran en ascenso. A los treinta días la población de macrófagos ha descendido, las CS llegan a su pico máximo con el 49.8%, a la vez que los fibroblastos incrementan su población. En el período de sesenta días, los macrófagos y las CS presentan notables decrementos y los fibroblastos llegan a su máxima población con un 47.8% de la población endoneural total.

Tabla 2. Evolución cuantitativa de macrófagos (media \pm e.s.) en la rama peroneal del nervio ciático en ratas sin lesión (grupos control y maniobra) y con lesión por sección a 3, 7, 30 y 60 días.

TIEMPO (DÍAS)	GRUPO CONTROL POB.PROMEDIO (%)	GRUPO MANIOBRA POB.PROMEDIO (%)	GRUPO C/LESION POB.PROMEDIO (%)
3	1.6 \pm 0.5	3.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.7 *
7	2.0 \pm 0.3	3.1 \pm 0.0	25.3 \pm 3.2 *
30	1.5 \pm 0.6	2.3 \pm 0.4	10.5 \pm 1.7
60	2.4 \pm 0.1	2.4 \pm 0.5	4.6 \pm 1.0

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, $P < 0.05$

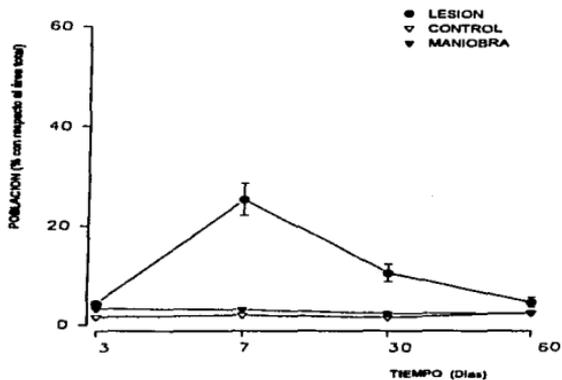


Figura 9. Evolución de la población de macrófagos expresada en porcentajes con respecto al área total del nervio ciático, con y sin lesión por sección, en ratas adultas.

Tabla 3. Evolución cuantitativa de células de Schwann (media \pm e.e.) en la rama peroneal del nervio ciático en ratas sin lesión (grupos control y maniobra) y con lesión por sección a 3, 7, 30 y 60 días.

TIEMPO (DÍAS)	GRUPO CONTROL POB.PROMEDIO (%)	GRUPO MANIOBRA POB.PROMEDIO (%)	GRUPO C/LESION POB.PROMEDIO (%)
3	32.6 \pm 1.5	34.7 \pm 4.6	18.9 \pm 1.7 *
7	34.6 \pm 0.7	32.4 \pm 8.1	15.5 \pm 2.1 *
30	33.9 \pm 6.4	33.6 \pm 5.4	49.6 \pm 2.2 *
60	30.5 \pm 9.1	32.1 \pm 1.0	14.7 \pm 1.0 *

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, $P < 0.05$

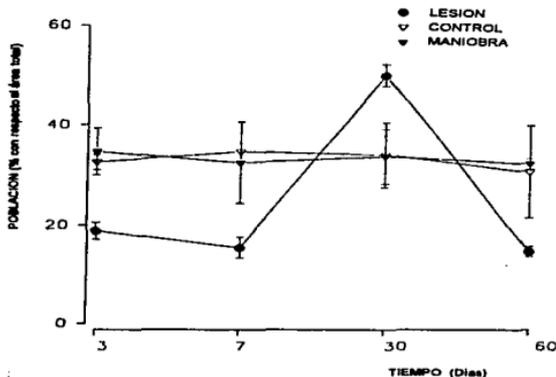


Figura 10. Evolución de la población de células de Schwann expresada en porcentajes con respecto al área total del nervio ciático, con y sin lesión por sección, en ratas adultas.

Tabla 4. Evolución cuantitativa de fibroblastos (media \pm s.e.) en la rama peroneal del nervio ciático en ratas sin lesión (grupos control y maniobra) y con lesión por sección a 3, 7, 30 y 60 días.

TIEMPO (DÍAS)	GRUPO CONTROL POB.PROMEDIO (%)	GRUPO MANIOBRA POB.PROMEDIO (%)	GRUPO C/LESION POB.PROMEDIO (%)
3	15.8 \pm 1.6	14.5 \pm 1.1	10.3 \pm 0.6
7	16.4 \pm 1.9	14.5 \pm 0.4	13.7 \pm 1.4
30	15.2 \pm 0.6	13.5 \pm 0.9	21.4 \pm 3.1 *
60	15.9 \pm 1.6	13.9 \pm 1.2	47.8 \pm 3.3 *

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, $P < 0.05$

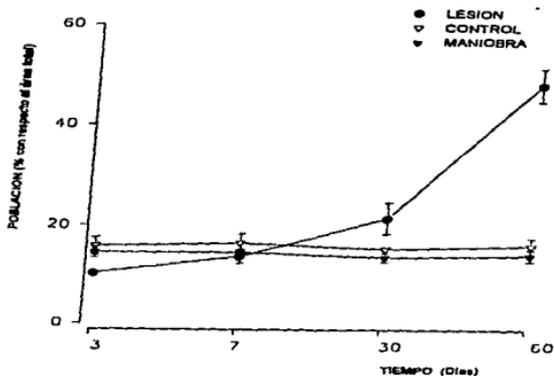


Figura 11. Evolución de la población de fibroblastos en el nervio ciático, expresada en porcentajes con respecto al área total del nervio ciático, con y sin lesión por sección, en ratas adultas.

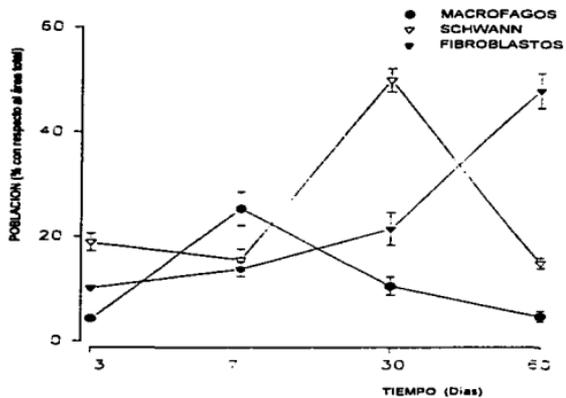


Figura 12. Evolución comparativa de las tres poblaciones intraneurales: macrófagos, células de Schwann y fibroblastos en el nervio ciático con lesión por sección en ratas adultas.

DISCUSION

Al analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo de la evolución de cada población celular en el nervio periférico, se observa que en el caso de los macrófagos, presentan una población residente promedio en el nervio normal de 1.8%, la cual no difiere básicamente de valores reportados en estudios previos utilizando anticuerpos como el ED-1 y el ED-3 (Monaco *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1993).

Tres días después de la lesión la población se duplica con respecto a la normal, y se dispara drásticamente a los siete días, hasta llegar a conformar el 25% de la población celular neural siendo la etapa en la cual alcanzaron su pico máximo. Este comportamiento coincide con lo esperado en cuanto a una rápida y masiva respuesta inicial de reclutamiento de macrófagos tanto residentes como provenientes de monocitos circulantes que entran y se activan en la zona de lesión para dar inicio a la reparación del tejido dañado.

De acuerdo con Perry *et al.* (1987), el periodo postlesión de máximo reclutamiento de macrófagos es antes y durante el tiempo de máxima proliferación de CS, por lo que se podría considerar que en el NP seccionado dos eventos totalmente diferentes la degeneración y la regeneración, se presentan casi al mismo tiempo una vez ocurrido el daño en el nervio.

Durante la degeneración el aumento y activación de los macrófagos podría reflejar una faceta del desarrollo de la lesión: inmediatamente después del trauma el conjunto de células y factores involucrados en la respuesta inflamatoria inicial se activan y se observa una alta actividad fagocítica, a la vez que el tejido presenta procesos degenerativos desde el momento de la lesión, llegando posiblemente, a la máxima degeneración en el periodo comprendido entre los siete días, y requiriendo por lo tanto, la respuesta de una elevada cantidad de células encargadas de la limpieza de restos tisulares, lo cual justifica la alta cantidad de macrófagos presentes en esta etapa. El decremento paulatino posterior en la población es contrario a la explosión que se da inicialmente, y que podría estar asociado al requerimiento de una alta presencia de macrófagos durante los eventos posteriores de regeneración, ya que éstos, además de su función fagocítica participan en la producción de citocinas promotoras de la proliferación celular. Adicionalmente, varios trabajos sugieren que los restos de mielina procesados por macrófagos juegan un papel primario en la respuesta mitótica de las CS (Baichwal *et al.*, 1988) y fibroblastos, particularmente. Otra actividad relevante que realizan los macrófagos es el reciclaje del colesterol, necesario para la formación de la mielina por las CS proliferantes (Boyles *et al.*, 1989).

En estudios recientes se ha demostrado que el incremento temprano en la población de macrófagos también está asociado con el aumento en el potencial regenerativo de los axones

del SNP, que es significativamente mayor que en el SNC. En el SNP los monocitos procedentes del torrente sanguíneo llegan rápidamente al sitio del trauma diferenciándose en macrófagos activados que remueven los restos de la mielina y los axones degenerantes (Beuche *et al.*, 1984; Friede y Beuche, 1993; Griffin *et al.*, 1992), además de estimular el incremento en la expresión y secreción de moléculas que contribuyen en la regeneración axonal en células como Schwann, principalmente. Lo anterior contrasta con la respuesta que es vista en el SNC después de la axotomía, ya que son muy pocos los monocitos que entran y se activan en el sitio dañado. La microglia residente tiene una respuesta reducida y demorada (Avelino *et al.*, 1995) que prolonga la fase degenerativa y demora la limpieza de los restos celulares, por lo que el ambiente necesario para la regeneración no es producido y en la mayor parte del SNC dañado no se llegan a regenerar las rutas axonales. En este sentido, se ha deducido que los macrófagos pueden también degradar moléculas inhibitoras específicas que están presentes en la mielina central y que inhiben el crecimiento axonal (Caroni & Schwab, 1988).

Para comparar la respuesta de los macrófagos en SNC y SNP, Perry *et al.*, (1987) hicieron un estudio inmunocitoquímico de carácter descriptivo en rata y ratón. Después de la lesión de los nervios óptico y ciático, procesaron el tejido utilizando anticuerpos monoclonales únicamente contra macrófagos, e hicieron sus observaciones en microscopio de luz. Ellos encontraron que existe diferencia de la respuesta en cuanto a la ubicación de las células fagocíticas, ya sea en SNC o en SNP, pero no hay diferencia a nivel de especies. Estos autores reportaron la máxima población de macrófagos en SNP entre tres y cinco días después de la lesión, pero no hacen una descripción explícita de su método de cuantificación. Su discusión se centra en la importancia de los macrófagos durante la degeneración del nervio, puesto que su actividad de degradación del tejido lesionado contribuye a una regeneración más efectiva de las fibras dañadas, como acontece en el SNP.

En este contexto Avelino *et al.*, (1995) plantean en su trabajo un objetivo similar para evaluar la respuesta de reclutamiento de macrófagos en SNC y SNP durante la degeneración Walleriana, obteniendo que la máxima población, en el NP, se presentó a los 21 días postlesión; sus resultados difieren a los reportados por Perry *et al.*, (1987), así como con los obtenidos en el presente trabajo, donde el pico máximo de macrófagos se observó a los siete días. Aquí observamos que el pico máximo de los 21 días que reportan Avelino *et al.*, (1995) se ubica entre las etapas de los siete y los treinta días del presente estudio, por lo que sería interesante determinar con certeza si en este intervalo que ha quedado descubierto en el presente trabajo, la población de macrófagos continúa aumentando y su comportamiento es semejante al reportado por estos autores o hay un descenso inmediato después del pico de los siete días y que habría que tomarlo en consideración en el caso de que el nervio sea

utilizado como un NPP, puesto que es importante conservar una alta población de macrófagos por las funciones que éstos realizan una vez que han sido activados.

En cuanto a la evolución en la población de CS se observa que inicialmente, es decir, en los períodos correspondientes a los tres y los siete días, se presenta un descenso que podría estar causado por la misma degeneración a que condujo el trauma inicial. La recuperación de la población se alcanza más lentamente, aunque en realidad desde estas etapas ya se presente una proliferación inicial, que no se refleja en términos de los porcentajes con respecto a la población endoneural total, sino hasta los treinta días, cuando las CS llegan a su pico máximo. Posteriormente a los sesenta días muestran otro decremento. Para explicar este último descenso se podría recurrir a la consideración que hacen Griffin *et al.*, (1993), quienes proponen que el decremento en el porcentaje de CS hacia los dos meses podría estar asociado a la atrofia celular, debido a que las nuevas CS que han proliferado en una etapa inicial degeneran al no establecer contacto axonal.

Miyamoto *et al.*, (1986), encontraron el pico máximo para macrófagos y CS a un mes postlesión, sin embargo, su periodo de evaluación más temprano fue precisamente a un mes. Posteriormente otros autores (Perry *et al.*, 1987; Clemence *et al.*, 1989; Komiyama y Suzuki, 1992; Silronen *et al.*, 1992; Avellino *et al.*, 1995) encontraron las máximas poblaciones para ambos casos en tiempos diferentes al de treinta días, diseñando estudios que empezaban en tiempos más cercanos al momento de la lesión. Aunque la cuantificación de células la realizaron con el microscopio electrónico, sin utilizar ningún marcador inmunológico. En condiciones normales las CS se identifican por la presencia de su membrana basal, pero es más complicado diferenciar entre macrófagos y fibroblastos quiescentes del nervio periférico; en condiciones de lesión, los cambios en el tejido, según las etapas degenerativa y de regeneración, aumentan la complejidad para definir los diversos tipos celulares: las CS pierden su membrana basal y presentan una marcada actividad fagocítica, los macrófagos y los fibroblastos cambian sus formas elongadas y presentan una alta motilidad. En este caso los propios autores reconocen la dificultad para distinguir entre fibroblastos y células perineurales, sin embargo, en su metodología no establecen criterios definidos para reconocer a cada tipo celular.

En un trabajo realizado por Clemence *et al.*, (1989), cuyo principal objetivo fue comparar la proliferación de CS mielinizantes y no mielinizantes posterior a la lesión del nervio, en ratas jóvenes, emplearon los anticuerpos anti-S:100 y anti-P₀ para identificar CS y anticuerpos monoclonales para macrófagos. El período en el que encontraron la población máxima de CS y de macrófagos fue de tres y de dos días, respectivamente.

Más tarde Komiyama y Suzuki (1992) establecieron claramente la influencia determinante de la edad del individuo sobre la respuesta proliferativa de las CS después de la lesión en el nervio ciático. En su estudio emplearon marcadores específicos para identificar CS, fibroblastos y macrófagos. La respuesta proliferativa se midió con base en la incorporación de timidina tritiada en cultivo de tejidos. En sus resultados cuantitativos muestran que para ratones de tres días de edad la proliferación de CS decae drásticamente a partir de la lesión del nervio y durante el transcurso de su estudio continúa en descenso, sin observarse alguna recuperación. Cabe mencionar que el tiempo total de estudio fue sólo de siete días, por lo que sería interesante llevar el tiempo de estudio a intervalos más largos. En los animales lesionados a los siete días de edad, se observó un comportamiento similar en la respuesta proliferativa de las CS que la presentada en los individuos de tres días de edad, aunque el descenso en la respuesta fue más paulatino. Sin embargo, el contraste es notable cuando la lesión del nervio fue hecha en animales de sesenta días de edad, donde la proliferación de CS llega a un pico máximo, superior al 20% del normal, a los tres días postlesión. Ellos concluyeron que en nervios degenerantes de ratones jóvenes hay factores que actúan como mitógenos para fibroblastos pero no para CS. Estos resultados podrían estar relacionados con el estado de mielinización en que se encuentran las CS, y sería interesante hacer evaluaciones a diferentes periodos entre los seis y sesenta días de edad del individuo, para determinar el momento en el que las CS inician la respuesta proliferativa.

En lo que se refiere al comportamiento de los fibroblastos, observamos que durante los primeros días postlesión, presentan un crecimiento lento, en el periodo comprendido entre uno y dos meses el incremento se acelera, alcanzando su pico de máxima proliferación a los sesenta días. Sin embargo, su población podría presentar un aumento posterior, tomando en cuenta los resultados que obtuvieron Miyamoto *et al.*, (1988), quienes reportaron un pico máximo de proliferación de fibroblastos a los seis meses postlesión. Este crecimiento tardío en la población de fibroblastos podría estar relacionado a su función restauradora, realizada en un ambiente libre de restos degenerantes, donde una vez que los efectos del trauma inicial se han llevado a cabo y han cesado de proliferar otras poblaciones celulares intraneurales, los fibroblastos proliferan ocupando los espacios restantes y formando el tejido cicatrizante.

Sironen *et al.*, (1992) utilizan marcadores inmunológicos para identificar CS, fibroblastos y macrófagos con el objetivo de relacionar la influencia del axón en la proliferación de CS e identifican una proliferación máxima a los catorce días postlesión. La diferencia con respecto al presente estudio podría estar dada por variables metodológicas, particularmente en cuanto a la técnica de evaluación, debido a que estos autores hacen una distinción en el conteo de CS en el nervio degenerante y en regeneración con base a la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y no evalúan todas las CS presentes en el nervio, es decir,

tanto las que permanecieron intactas después de la lesión, como las células originadas por la proliferación después de la lesión.

En el estudio realizado por Salonen *et al.* (1988), las CS son identificadas mediante el anticuerpo anti-S:100, encontrando su pico máximo al mes postlesión, similar que para los fibroblastos, definidos por exclusión como células S:100 negativas; los macrófagos fueron identificados por su reacción con el anticuerpo anti-tripsina-1- α . Sus resultados en CS y macrófagos son similares a los del presente estudio, no sucediendo así en el caso de fibroblastos, lo cual podría ser debido a que no están utilizando un marcador específico para éstos y que el tiempo de estudio fue más corto.

La diferencia temporal en la que cada población celular llega a su pico máximo, puede ser debida a varios factores: en cuanto al comportamiento de los macrófagos, bajo condiciones de lesión éstos no llegan a proliferar sino que son reclutados desde el exterior y arriban de forma temprana y masiva al sitio del daño, de modo contrario a lo que acontece con las CS y los fibroblastos, puesto que ambos sufren una pérdida en su población normal, ocasionada por la lesión al NP, misma que es recuperada a través de la respuesta proliferativa que llevan a cabo paulatinamente las células restantes y que se refleja hasta periodos más prolongados, dependiendo de la función intrínseca de cada tipo celular.

Tomando en cuenta la suma de los porcentajes de las poblaciones de las células estudiadas en el presente trabajo vemos que, generalmente, se presentan en una cantidad menor al 100% por lo que se debe considerar que un porcentaje variable lo aporten principalmente células como las cebadas, las endoteliales y los pericitos de los vasos sanguíneos, especialmente en los nervios lesionados, en los que se observa un notable aumento en sus paredes después de la lesión (en una menor cantidad las células cebadas que intervienen en la respuesta inflamatoria). Adicionalmente cabe mencionar que una alta cantidad de células S:100 positivas no fueron tomadas en cuenta por no cumplir con todos los criterios preestablecidos para ser consideradas como CS.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de la cuantificación realizada mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas con los anticuerpos anti-S:100 y HIS43 para identificación de células de Schwann y fibroblastos respectivamente, y de histoquímica enzimática mediante la reacción de la esterasa inespecífica para identificación de macrófagos, después de lesión por sección completa de la rama peroneal del nervio ciático de ratas adultas de la cepa Long Evans a 3, 7, 30 y 60 días, se concluye que:

1. Existe una respuesta cuantitativa y cualitativa diferente entre células de Schwann, fibroblastos y macrófagos después de la lesión del nervio.
2. Temporalmente se presentó un reclutamiento temprano de macrófagos que alcanzó su población máxima a los siete días, mientras que el pico de máxima proliferación para células de Schwann se presentó al mes posterior a la lesión y a los dos meses para fibroblastos.
3. El nervio periférico que sea utilizado como trasplante se debe someter a una presión con un tiempo intermedio entre los siete y los treinta días si se pretende implantar la mayor cantidad de células de Schwann y con ello lograr una mejor remielinización y estimulación del crecimiento neurítico, a la vez que se conserva en el tejido un alto número de macrófagos cuya actividad favorezca los eventos posteriores de regeneración.

PERSPECTIVAS

En consideración de los resultados obtenidos se sugiere la realización de estudios similares, con base al mismo diseño experimental para hacer la evaluación de las poblaciones intraneurales a los tiempos correspondientes entre los siete y los treinta días, para detectar si se presentan variaciones importantes en CS y macrófagos.

Realizar otros modelos experimentales que aporten conocimientos que ayuden a integrar el panorama general del metabolismo neural bajo condiciones de lesión.

REFERENCIAS

- Acheson, A., Barker, P., Alderson, R., Miller, F., Murphy, R. 1991. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron* 7:765-75.
- Aguayo, A., Dickson, R., Trecarten, J., Attiwell, M., Bray, G., Richardson, P. 1975. Ensheatment and myelination of regenerating peripheral nervous system fibers by transplanted optic nerve glia. *Neurosci. Let.* 9:97-104.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland Publish. Inc. N. York. pp 971-1000.
- Ardvison, B. 1977. Cellular uptake of exogenous horse radish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta Neuropathol.* 37:35-41.
- Avellino, A., Hart, D., Dailey, A., McKinnon, M., Ellegala, D., Klot, M. 1995. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. *Exp. Neurol.* 138:183-98.
- Bahr, M., Eschweiler, G., Wolburg, H. 1992. Precrushed sciatic nerve grafts enhance the survival and axonal regrowth of retinal ganglion cells in adult rats. *Exp. Neurol.* 116:13-22.
- Baichwal, R., Bigbee, J., De Vries, G. 1988. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 1701-05.
- Bancroft, J. 1990. Enzyme histochemistry. In: *Theory and practice of histological techniques*. Chp 18, (edited by Bancroft, J., Stevens, A.) 3rd ed. Churchill Livingstone, London UK. pp 379-399.
- Bandtlow, C., Heumann, R., Schwab, M., Thoenen, H. 1987. Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. *EMBO J.* 6:891-9.
- Baran-Van Evercoren, A., Kleinman, H.K., Ohno, S., Naranjos, P., Schwartz, J.P. and Dubois-Dalcq M.E. 1982. Nerve growth factor, laminin and fibronectin promote neurite growth in human fetal sensory ganglia cultures. *J. Neurosci. Res.* 6:179-183.
- Beuche, W., Friede, R. 1984. The rol of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.* 13:787-98.
- Blakemore, W. 1977. Remyelination of central nervous system axons by Schwann cell transplanted from sciatic nerve. *Nature* 266:68-69.
- Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y., Nathan, C. 1992. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 267:23301-8.
- Boytes, J., Zollner, C., Anderson, L., Kosik, L., Pitas, R., Weisgraber, K., Hui, D., Mahley, R., Gebike-Haerter, P., Ignatius, M., Shooter, E. 1989. A role for a lipoprotein E, apolipoprotein A-1, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J. Clin. Invest.* 83:1015-31
- Bradley, W., Asbury, A. 1970. Duration of synthesis phase in neurite cells in mouse sciatic nerve during degeneration. *Exp. Neurol.* 26:275-82.
- Bray, G., Aguayo, A. 1974. Regeneration of peripheral unmyelinated nerves. Fate of the axonal sprouts which develop after injury. *J. Anat.* 117:517-29.
- Brockes, J., Fields, K., Raff, M. 1977. A surface antigenic marker for rat Schwann cells. *Nature.* 266:364-366.

- Bunge, R., Bunge, M. 1983. Interrelationship between Schwann cell function and extracellular matrix production. *Trends Neurosci.* **6**:499-505.
- Caroni, P., Schwab, M. 1986. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J. Cell Biol.* **106**:1281-8.
- Clemence, A., Mirsky, R., Jessen, R. 1989. Non-myelin-forming Schwann cells proliferate rapidly during Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J. Neurocytol.* **18**:185-92.
- Coggi, G., Dell'Orto, P., Viale, G. 1986. *Avidin-biotin methods*. In: Immunocytochemistry. Eds. Polak, J., Van Norden, S. 2nd. ed. John Wright and Sons Ltd. England. pp 54-70.
- Corbo, M., Quattrini, A., Latov, N., Hays, A. 1993. Localization of GM1 and Gal(B1-3)GalNAc antigenic determinants in peripheral nerve. *Neurology.* **43**:809-814.
- Covault, J., Cunningham, J., Sanes, J. 1987. Neurite outgrowth on cryostat sections of innervated and denervated skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **82**:4544-8.
- Cummings, D., Brunjes, P. 1995. Migrating luteinizing hormone releasing-hormone (LHRH) neurons and processes are associated with a substrate that expresses S100. *Dev. Brain Res.* **88**:148-57.
- Danielsen, N., Kems, J.M., Holmquist, B., Zhao, Q., Lundburg, G., Kanje, M. 1994. Predegenerated nerve grafts enhance regeneration by shortening the initial delay period. *Brain Res.* **666**:250-254.
- Daniiloff, J., Levi, G., Grumet, M., Rieger, F., Edelman, G., 1986. Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J. Cell Biol.* **103**:929-45.
- Davis, J., Stroobant, P. 1990. Platelet derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* **110**:1353-60.
- Denny-Brown, D. 1946. Importance of neural fibroblasts in the regeneration of nerve. *Arch. Neurol. Psychiat.* **58**:171-215.
- Dijkstra, C., Dopp, E., Joling, P., Kraal, G. 1985. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* **54**:589-99.
- Eccleston, P. 1992. Regulation of Schwann cell proliferation: mechanisms involved in peripheral nerve development. *Exp. Cell Res.* **199**:1-9.
- Fawcett, D. 1994. *Tratato de Histología*. 11a. ed. Interamericana-McGraw Hill. Madrid. pp 313-368.
- Fawcett, J., Keynes, R. 1990. Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **13**:43-60.
- Fernández-Valle C., Bunge R., Bunge M. 1995. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.* **24**:667-79.
- Friede, R., Beuche, W. 1993. Macrophage functional properties during myelin degradation. *Adv. Neurol.* **50**:327-38.
- Friede, R., Samorajski, T. 1989. The clefts of Schmidt-Lanterman: a quantitative electron microscopic study of their structure in developing and adult sciatic nerves of the rat. *Anat. Rec.* **165**: 89-102.
- Friede, R., Bischhausen, R. 1980. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in sublesional sections. *J. Neurol. Sci.* **44**:181-203.
- Gehrmann, J., Kreutzberg, G. 1991. Characterization of two new monoclonal antibodies directed against rat microglia. *J. Comp. Neurol.* **313**:409-30.
- Genesser, F. 1993. *Histología*. 2a. ed. Editorial Médica-Panamericana. pp 303-304.

- Ghabriel, M., Allit, G. 1981. Incisures of Schmidt-Lanterman. **Progress in Neurobiol.** 17:25-38.
- Gomori, G. 1952. **Microscopic Histochemistry.** Chicago University Press. pp 195.
- Goodrum, J., Novicki, D. 1985. Macrophage-like cells from explant cultures of rat sciatic nerve produce apolipoprotein E. **J. Neurosci. Res.** 20:457-62.
- Greene, E. Ch. 1983. **Anatomy of the rat.** Hafner Publish. Co. New York. pp 370.
- Griffin, J., George, R., Ho, T. 1993. Macrophage systems in peripheral nerves. A review. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 62(6):563-60.
- Ham, A., Cormack, D. 1984. **Tratado de Histología.** 8a. ed. Ed. Interamericana, México, pp 1080.
- Hermans, M., Hartsuiker, H., Opsteiten, D. 1989. An in situ study of B-lymphocytopoiesis in rat bone marrow. Topographical arrangement of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells and pre-B cells. **J. Immunol.** 142:67-73.
- Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C., Thoenen H. 1987. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. **J. Cell Biol.** 104:1623-1631.
- Kligman, D., Hill, D., 1988. The S:100 protein family. **Trends Biochem. Sci.** 13:437-43.
- Komiyama, A., Suzuki, K. 1992. Age-related differences in proliferative responses of Schwann cells during Wallerian degeneration. **Brain Res.** 673: 267-275.
- Krstic, R. 1989. **Los tejidos del hombre y de los mamíferos.** Interamericana McGraw-Hill. México. pp 397.
- Lander, A., 1989. Understanding the molecules of neural cell contacts: emerging patterns of structure and function. **Trends Neurosci.** 12:189-95.
- Ley General de Salud.** Título Séptimo: De la Investigación que Incluya la Utilización de Animales de Experimentación. Ed. Pomúa. 6a. ed. México, D.F. 1990. pp 430-31
- Lieberman, A. 1971. The axon Reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. **Int. Rev. Neurobiol.** 14:49-124.
- Lindholm, D., Heumann, R., Meyer, M., Thoenen, H. 1987. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. **Nature.** 330:658-9.
- Lunn, E., Perry, V., Brown, M., Rosen, H., Gordon, S. 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. **Eur. J. Neurosci.** 1:27-33.
- Martin, J., Webster, H. 1973. Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure and axon relationships. **Dev. Biol.** 32:417.
- Martini, R., Schachner, M. 1985. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L-1, N-CAM and myelin associated glycoprotein) in regenerating mouse sciatic nerve. **J. Cell Biol.** 100:1735-47.
- Mirsky, R., Jessen, K. 1990. Schwann cell development and the regulation of myelination. **Sem. Neurosci.** 2:423-35.
- Miyamoto, Y., Higaki, T., Sugita, T., Ykuta, Y., Tsuge, K. 1986. Morphological Reaction of Cellular Elements and the Endoneurium Following Nerve Section. **Periph. Nerve Repair Regen.** 3:7-18
- Monaco S., Gehrmann J., Ralvich G., Kreutzberg G. 1992. MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. **J. Neurocytol.** 21:623-34.

- Moore, B. 1985. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**:739-44.
- Oldfors, A. 1980. Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropathol.* **68**:43-9.
- Olsson, Y., Sjostrand, J. 1989. Origin of macrophages in Wallerian degeneration of peripheral nerves demonstrated autoradiographically. *Exp. Neurol.* **23**:102-112.
- Pearse, A. 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*. Vol. II, 3th ed. Churchill Livingstone, London, pp 781-807.
- Perry, V., Brown, M. 1992. Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair *Microscopies* **14**:401-6.
- Perry V., Brown M., Gordon S. 1987. The macrophage response to central and peripheral nerve injury. *J. Exp. Med.* **165**:1219-23.
- Peters, A., Palay, S., Webster, H. 1976. Microglia. In *The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells*, (edited by Peters, A., Palay, S., Webster, H.) Philadelphia: W.B. Saunders Co. pp 406.
- Pierat, F., Martinet, Y., Martinet, N., Vignaud, J. 1994. Immunohistochemical methods for studying mononuclear phagocytes in tissue sections. *J. Immunol. Met.* **174**:133-54.
- Podhasky, R., Myers, R. 1993. The vascular response to nerve crush: relationship to Wallerian degeneration and regeneration. *Brain Res.* **623**:117-23.
- Politis, M., Sternberger, N., Ederle, K., Spencer, P. 1982. Studies on the control of myelinogenesis. IV. Neuronal induction of Schwann cell myelin-specific protein synthesis during nerve fiber regeneration. *J. Neurocyt.* **2**:1252-66.
- Price, D., Porter, K. 1972. The response of ventral horn nerves to axonal transection. *J. Cell Biol.* **63**:24-37.
- Prineas, J., McLeod, J. 1976. Chronic relapsing polyneuritis. *J. Neurol. Sci.* **27**:427-58.
- Raff, M., Abney, E., Brockes, J., Hornby-Smith, A. 1978. Schwann cell growth factors. *Cell* **15**:813-22.
- Ratner, N., Lieberman, N., Bunge, R., Glasser, L. 1988. The neuronal cell-surface molecule mitogenic for Schwann cells is a heparin-binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**:6992-96.
- Reynolds, M., Woolf, C. 1992. Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J. Neurocytol.* **21**:50-56.
- Ridley, A., Davis, J., Strocobant, P., Land, H. 1989. Transforming growth factors-B₁ and -B₂ are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* **109**:3419-24.
- Robinson, G., Ellis, I., McLennan, K. 1990. Immunocytochemistry. In: *Theory and practice of histological techniques*. Chp. 20. Churchill Livingstone, London UK, pp 413-420.
- Ross, M., Reith, E., Romrell, L. 1992. *Histología: Texto y Atlas Color*. 2a. ed. Editorial Médica Panamericana. México pp 239-53.
- Rutka, J., Apodaca, G., Stern, R., Rosenblum, M. 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J. Neurosurg.* **69**:155-170.
- Saida, K. & Saida, T. 1986. Proliferation of Schwann cells in demyelinated rat sciatic nerve. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **71**:251-56.

- Salonen, V., Aho, H., Roytta, M., Pelttonen, J. 1985. Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropath. Berl.* **75**:331-336.
- Schachner, M. 1990. Functional implications of glial cell recognition molecules. *Sem. Neurosci.* **2**:497-507.
- Schlaepfer, W. & Bunge, R. 1973. The effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J. Cell Biol.* **69**:456-70.
- Schubert, T., Friede, R. 1981. The role of endoneurial fibroblasts in myelin degradation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **40**:134-54.
- Selinfreund, R., Barger, S., Pledger, W., Van Eldik, L. 1991. Neurotrophic protein S:100B stimulates glial cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **88**:3554-58.
- Sironen, J., Collan, Y., Roytta, M. 1992. Axonal reinnervation does not influence Schwann cell proliferation after rat sciatic nerve transection. *Brain Research.* **654**:303-11.
- Snipes, G., Suter, U., Weirher, A., Shooter, E. 1992. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J. Cell Biol.* **117**:225-38.
- Sterio, D. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microscopy.* **134**:127-36.
- Stevens, A., Lowe, J. 1993. *Texto y atlas de histología*. Doyma libros. Madrid. pp 378.
- Stevens, A. 1990. The Haematoxylin. In: *Theory and practice of histological techniques*. Chp 7. (edited by Bancroft, J., Stevens, A.) 3rd ed. Churchill Livingstone, London UK. pp 112.
- Stoll, G., Griffin, J., Li, C., Trapp, B. 1989. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* **18**:671-83.
- Taniuchi, M., Clark, H., Johnson, E. 1986. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Pro. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**:4094-8.
- Taniuchi, M., Clark, H., Schweitzer, J., Johnson, E. 1985. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact and binding properties. *J. Neurosci.* **5**:684-81.
- Thomas, P. 1966. The cellular response to nerve injury. 1. The cellular outgrowth from the distal stump of transected nerve. *J. Anat.* **100**(2):287-303.
- Thomas P., Berthold C., Ochoa J. 1993. Microscopic Anatomy of the peripheral nervous system. In: *Peripheral Neuropathy*. 3rd ed. vol I (ed. P.J. Dyck, P. K. Thomas, J. W. Griffin, P. Low and J.F. Poduslo) Philadelphia: W. B. Saunders Co. pp 28-91.
- Thomas, P., Jones, D. 1967. The cellular response to nerve injury. 2. Regeneration of the perineurium after nerve section. *J. Anat.* **101**(1):45-55.
- Weerasuriya, A. 1988. Patterns of change in endoneurial capillary permeability and vascular space during Wallerian degeneration. *Brain Res.* **448**:181-187.
- Weiss, L. 1988. *Cell and tissue biology*. 9th ed. Urban and Schwarzenberg, Baltimore. pp 155-88.
- Young, J. 1949. Factors influencing the regeneration of nerve. *Adv. Surg.* **1**:165
- Yu, L., Rostami, A., Silvers, W., Larossa, D., Hickey, W. 1990. Expression of major histocompatibility complex antigens on inflammatory peripheral nerve lesions. *J. Neuroimmunol.* **30**:121-8.
- Zimmerman, U., Schlaepfer W. 1984. Multiple forms of Ca-activated protease from rat brain and muscle. *J. Biol. Chem.* **259**:3210.