

**NATURALEZA DE LOS MACROFAGOS EN LA DEGENERACION
POST-TRAUMATICA DEL NERVI0 PERIFERICO. ESTUDIO
INMUNOCITOQUIMICO**

**THE NATURE OF MACROPHAGES IN THE LESIONAL ZONE OF
CRUSHED PERIPHERAL NERVES. INMUNOCYTOCHEMICAL STUDY**

A. BORREGO, J. BOYA, A. LOPEZ-CARBONELL y J. CALVO

Departamento de Histología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense.
Madrid.

Recibido, 12 de Julio de 1988. Aceptado, 5 de Noviembre de 1988

RESUMEN

Se estudia con métodos inmunocitoquímicos la naturaleza de los macrófagos en la zona de lesión de nervios periféricos sometidos a compresión. En los nervios normales, las proteínas de los neurofilamentos son específicas para los axones neuronales y las proteínas S-100 y Glial Fibrillar Acida para las células de Schwann. La lisozima es abundante en los macrófagos hematógenos. La vimentina está presente tanto en las células de Schwann como en los leucocitos sanguíneos. Según el patrón de inmunotinción frente a un conjunto de marcadores celulares antigénicos concluimos que los macrófagos de la zona lesional del nervio ciático de rata sometido a compresión derivan fundamentalmente de los monocitos sanguíneos extravasados.

Palabras Clave:

Lisozima. Proteína S-100. Filamentos intermedios. Nervio periférico. Macrófagos

SUMMARY

The nature of macrophages in the lesional zone of crushed peripheral nerves has been studied immunocytochemically. In normal nerves, neurofilaments are specific for neuronal axons and S-100 protein and Glial Fibrillary Acidic Protein for Schwann cells. Lysozyme is abundant in hematogenous phagocytes. Vimentin is present in both Schwann cells and blood leukocytes. According to the pattern of immunostaining observed with a pannel of antibodies against cell-characteristic antigens we conclude that macrophages in the lesional zone of crushed rat sciatic nerves are largely derived from exudated blood monocytes.

Key Words:

Lysozyme. S-100 protein. Intermediate filaments. Peripheral nerve. Macrophages

INTRODUCCION

Las técnicas inmunocitoquímicas permiten localizar de modo específico y selectivo, antígenos presentes en las células y los tejidos. En el nervio periférico normal, las células de Schwann expresan antígenos citoplasmáticos característicos, como la proteína S-100 (18, 19), o las proteínas de los filamentos intermedios vimentina (1, 27) y proteína ácida gliofibrilar (1, 7, 9, 17).

Los neurofilamentos son tripletes de proteínas que constituyen los filamentos intermedios presentes exclusivamente en las prolongaciones axónicas neuronales (27, 34). La lisozima es una hidrolasa lisosómica característica de fagocitos hematógenos (23), que nunca se ha descrito en las fibras nerviosas normales o en degeneración Walleriana.

La compresión traumática de los nervios periféricos induce la aparición en la zona de la lesión de numerosas células con características macrofágicas. La detección por métodos inmunocitoquímicos de determinantes antigénicos característicos de tipos celulares determinados puede contribuir a aclarar el origen y naturaleza de las células espumosas todavía no establecido.

MATERIAL Y METODOS

En nuestro estudio hemos utilizado ratas albinas Wistar adultas como modelo experimental. Los animales, alojados en jaulas en grupos de tres se alimentaron con pienso prensado y agua "ad libitum", y se mantuvieron con un ciclo lumínico de 18 horas y temperatura entre 15° y 18° C.

Los animales se sacrificaron por decapitación previa anestesia etérea 5 y 7 días tras la compresión mecánica del tronco del nervio ciático expuesto quirúrgicamente en la mitad del muslo. En todos los casos la operación se realizó en condiciones asépticas, utilizando pinzas "Kocher" y comprimiendo durante 5 segundos en todos los casos con la misma intensidad. La piel se suturó con puntos de seda. En todos los casos se vigiló la recuperación postoperatoria de los animales. No se registraron muertes ni complicaciones sépticas de la herida quirúrgica.

Los nervios ciáticos lesionados de los animales sacrificados en cada periodo se disecaron cuidadosamente. Tras identificar el engrosamiento fusiforme de la zona de lesión en el tronco nervioso, se extrajo 1 cm de nervio a cada lado del mismo. Los nervios, una vez colocados rectos sobre una tablilla y atados sus extremos fueron siempre fijados por inmersión.

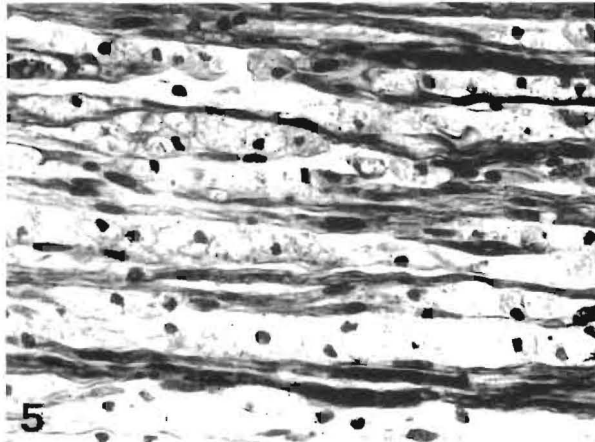
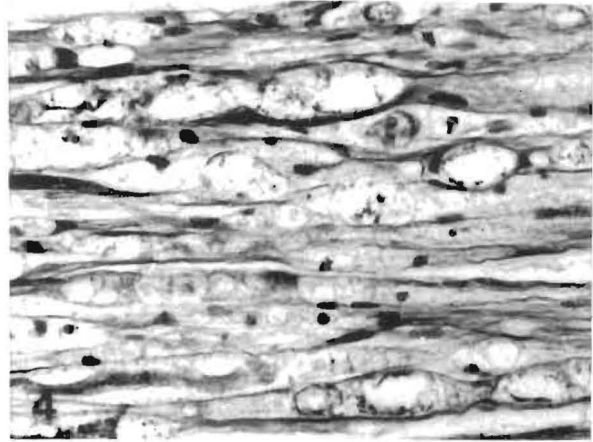
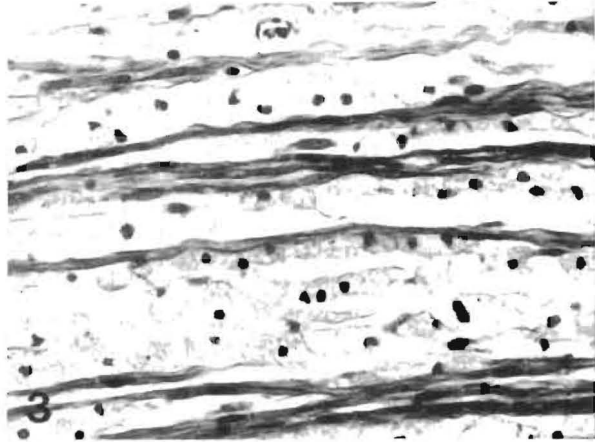
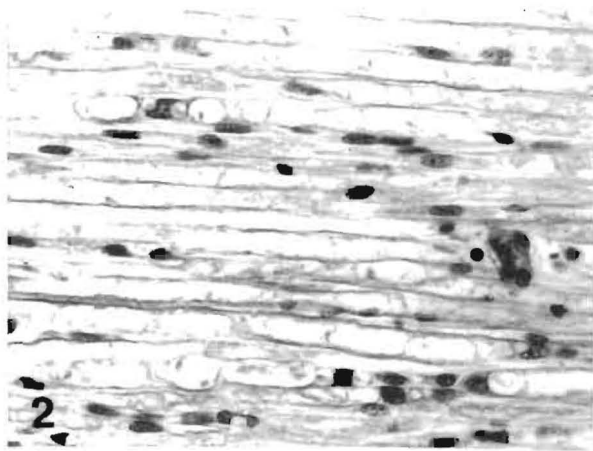
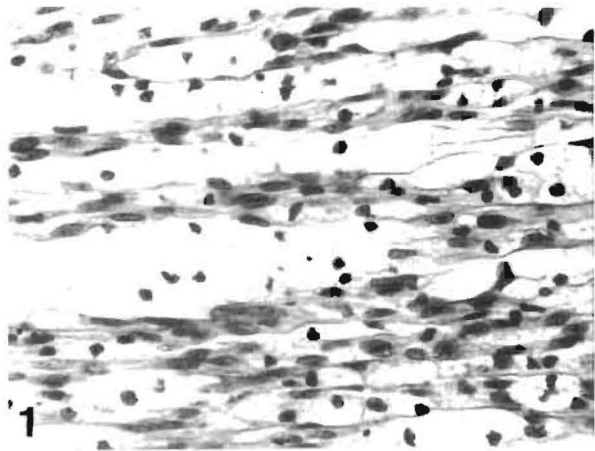
Para el estudio microscópico de rutina los nervios se fijaron en líquido de Bouin 18 horas a temperatura ambiente. El tejido se incluyó en parafina de modo convencional y los cortes desparafinados e hidratados se tiñeron con hematoxilina/eosina (H/E).

Las muestras destinadas al estudio inmunocitoquímico se fijaron 2-4 horas a 4°C en formalina al 10% pre-enfriada, posteriormente lavadas en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.2 a 4°C, durante 12-16 horas. El tejido se incluyó en parafina empleando tiempos cortos (alcohol de 70/96/100/Xilol, 15 min/3x7 min/2x5 min) y parafina de punto de fusión bajo (54°C), durante 40-90 min a 56°C. Los cortes se estiraron en un baño templado (45°C) y se montaron en portas secos revestidos por cromo-gel.

Procedimiento de inmunotinción: Según se detalla en la tabla I, los cortes se desparafinaron en xilol, la actividad peroxidasa endógena se bloqueó con un 2% H₂O₂ en metanol (5 min) y finalmente se hidrataron secuencialmente en alcoholes de graduación decreciente hasta llevarlos a PBS 0.05M, pH 7.4.

Todos los anticuerpos utilizados como primarios se diluyeron en PBS 0.05M pH 7.4, suplementado con 5% de suero no inmune de cerdo (NSS) para los anticuerpos monoclonales y 1% de ovoalbúmina. Todos los anticuerpos y antisueros fueron adquiridos a Dako Inc. (Dinamarca). Como control positivo se utilizó el tejido adecuado para cada antígeno. Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario en cada caso.

La inmunolocalización de los antígenos proteína S-100, proteína ácida gliofibrilar (GFA) y lisozima (LYZ), se realizó por un método de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP), modificado de Taylor (33), según se detalla en la tabla II. Para



cada antígeno utilizamos antisuero policlonal de conejo diluido adecuadamente (Tabla III). El antisuero de cerdo anti-conejo diluido 1:35 en PBS y el complejo PAP de conejo diluido 1:250 se emplearon respectivamente como anticuerpo puente y complejo terciario.

La inmunolocalización de los antígenos vimentina (VIM) y neurofilamento (NF), se realizó según un método de peroxidasa indirecto adaptado de Taylor (33), detallado en la tabla III. El marcaje se consiguió con anticuerpo peroxidado de conejo anti-ratón diluido 1:35 en PBS.

En todos los casos la actividad peroxidasa se reveló utilizando una dilución fresca de 0.003% DAB (Sigma) y 0.03% H₂O₂ en PBS. Tras lavar en destilada se aplicó un contraste nuclear tenue con hematoxilina (1 min) y los cortes fueron deshidratados, aclarados y montados en DePex (Serva).

TABLE I 5% NSS, 1% Ovoalbúmina en PBS 15 m

	Antisuero policlonal de conejo 30 m
	Lavado en PBS 3 x 5 m
30	Antisuero puente (cerdo anti-conejo) m
	Lavado en PBS 3 x 5 m
	Complejo PAP de conejo 15 m
	Lavado en PBS 3 x 5 m
con	Revelado de la actividad peroxidasa DAB + H ₂ O ₂ 5 m

TABLE II S-100 GFA LYZ VIM NF 1:420 1:300 1:400 1:8 1:250

TABLE III 5% NRS, 1% Ovoalbúmina en PBS 15 m

	Anticuerpo monoclonal (ratón) 30 m
	Lavado en PBS 3 x 5 m
	Anticuerpo de conejo anti-ratón marcada con peroxidasa 30 m
	Lavado en PBS 3 x 5 m
con	Revelado de la actividad peroxidasa DAB + H ₂ O ₂ 5 m

RESULTADOS

En el estudio realizado con técnicas de anilinas convencionales siete días tras la compresión traumática experimental del nervio ciático

de rata, aparecen en la zona de la lesión numerosas células con características macrofágicas, núcleo redondeado pequeño y citoplasma amplio, multivacuolado, de aspecto granular (Fig. 1). Estos macrófagos se localizan entre las células de Schwann de los cordones de Büngner, característicos de la regeneración nerviosa. Las células de Schwann de estos cordones presentan citoplasma pálido alargado, núcleos elongados y se disponen alineadas longitudinalmente paralelas al eje mayor del nervio.

El estudio del cabo distal en todas las técnicas empleadas siempre se realizó a 0.5 cm de distancia de la zona de la lesión. En este punto, las fibras nerviosas en degeneración Walleriana, muestran vacuolas ovoideas de mielina de aspecto vacío, perfectamente alineadas siguiendo la dirección de las fibras nerviosas (Fig. 2). En la zona estudiada, las células espumosas sólo aparecían ocasionalmente y en general, la cantidad de células espumosas, resultó ser mínima a lo largo del cabo distal.

Proteína ácida gliofibrilar:

La inmunolocalización de esta proteína fibrilar citoplasmática, es muy positiva en todas las células de Schwann de los cordones de Büngner en la zona de la lesión (Fig. 3). Las células espumosas son negativas. Sólo algunos de estos macrófagos presentan material granular intravacuolar positivo probablemente correspondiente a restos de citoplasma de células de Schwann (Fig. 3). En el cabo distal, la positividad perivacuolar es muy manifiesta en las fibras nerviosas en degeneración (Fig. 4). En este tramo, aparte de las células de Schwann, no se aprecian otras células positivas. Los acúmulos citoplasmáticos perinucleares en las células de Schwann aparecen como áreas longitudinales intensamente positivas, generalmente bordeadas por vacuolas degenerativas.

Proteína S-100:

El patrón de inmunotinción para este antígeno es muy superponible al descrito para la proteína ácida gliofibrilar. En ningún caso se observaron células espumosas positivas en los segmentos de nervio estudiados. En la zona de la lesión las células espumosas resultaron negativas (Fig. 5). Como se ha descrito para el anti-

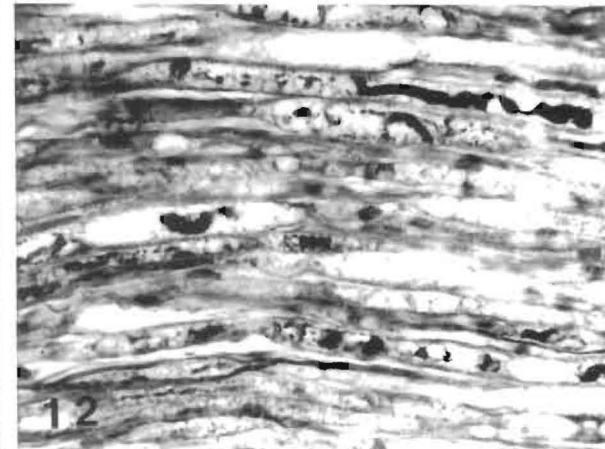
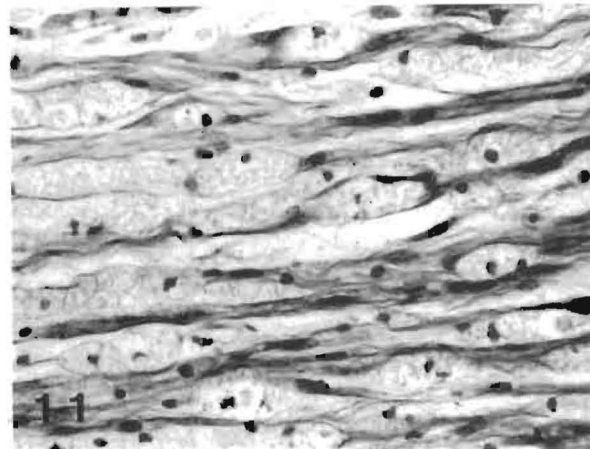
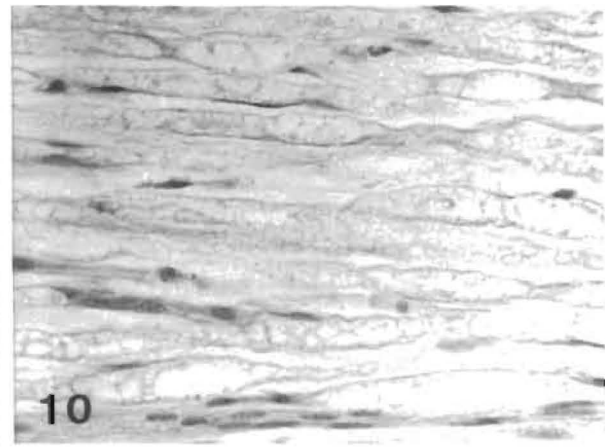
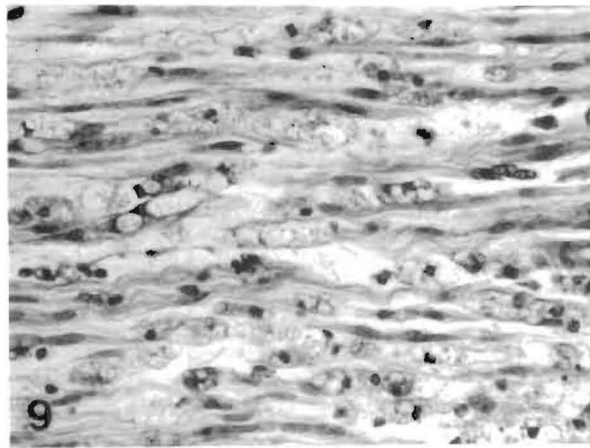
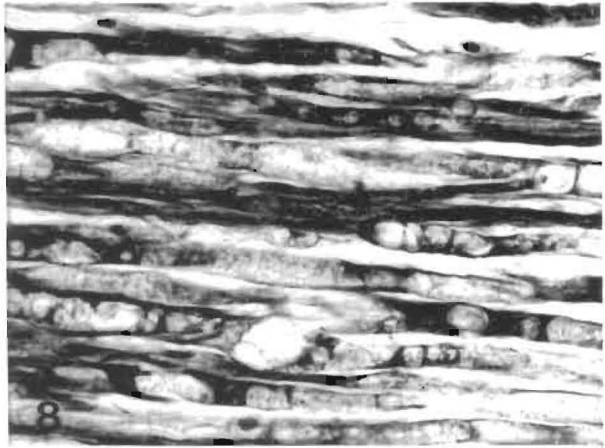
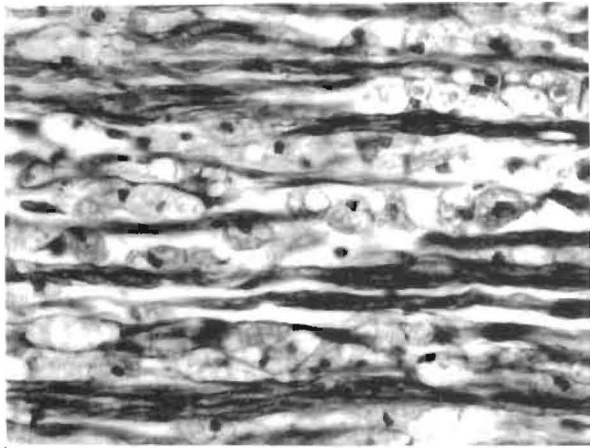


Fig. 1. Zona de lesión. H/E. x370. Numerosos macrófagos dotados de un citoplasma espumoso y finamente granular llenan los espacios entre las células de Schwann de los cordones de Büngner. Nótese las diferentes características nucleares de ambos tipos celulares.

Fig. 2. Cabo distal. H/E. x370. Fibras nerviosas en degeneración Walleriana. No se observan células espumosas.

Fig. 3. Zona de lesión inmunoteñida para proteína GFA. x370. Las células de los cordones de Büngner aparecen inmunoteñidas intensamente.

Fig. 4. Cabo distal inmunoteñido para proteína GFA. x370. Obsérvese el refuerzo periférico de las vacuolas en las células de Schwann en degeneración, así como la positividad citoplasmática en estas células. No se observan células espumosas.

Fig. 5. Zona de lesión inmunoteñida para proteína S-100. x370. Las células de los cordones de Büngner muestran una intensa inmunotinción citoplasmática.

Fig. 6. Cabo distal inmunoteñido para proteína S-100. x370. Las células de Schwann de las fibras nerviosas en degeneración Walleriana muestran una positividad citoplasmática intensa y difusa. Las "bandas" positivas corresponden a citoplasma perinuclear de las células de Schwann.

Fig. 7. Zona de lesión inmunoteñida para vimentina. x370. Tanto los macrófagos como las células de los cordones de Büngner son intensamente positivos. Nótese el refuerzo perivacuolar y la granulación intravacuolar en las células espumosas.

Fig. 8. Cabo distal inmunoteñido para vimentina. x370. El citoplasma de las células de Schwann en degeneración muestra una inmunotinción intensa y difusa. Las "bandas" positivas corresponden al acúmulo perinuclear de citoplasma.

Fig. 9. Zona de lesión inmunoteñida para lisozima. x370. Se observan numerosos macrófagos entre las células de Schwann de los cordones de Büngner, todos ellos dotados de abundantes gránulos citoplasmáticos intensamente positivos.

Fig. 10. Cabo distal inmunoteñido para lisozima. x370. Fibras nerviosas en degeneración Walleriana. No se observan células positivas.

Fig. 11. Zona de lesión inmunoteñida para proteínas de neurofilamentos. x370. Se observan neuritas delgadas, sinuosas, teñidas positivamente entre las células de Schwann de los cordones de Büngner.

Fig. 12. Cabo distal inmunoteñido para proteínas de neurofilamentos. x370. Se aprecian segmentos axónicos dilatados de diferentes tamaños en las fibras nerviosas en degeneración.

geno GFA, con frecuencia se detectó un material granular positivo en el interior de las vacuolas fagocíticas de las células espumosas, probablemente correspondiente a fragmentos de citoplasma de células de Schwann (Fig. 5). El resto del citoplasma de las células espumosas resultó totalmente negativo. A lo largo del cabo distal las células de Schwann de las fibras en degeneración Walleriana mostraron inmunotinción del citoplasma muy intensa en las zonas perinucleares (Fig. 6).

Vimentina:

En la zona de la lesión, las abundantes células espumosas, y las células de los cordones de Büngner, muestran una inmunorreacción positiva muy intensa en el citoplasma. En las células espumosas, la tinción consiste en un refuerzo neto de las vacuolas citoplasmáticas (Fig. 7).

En el cabo distal, las células de Schwann de las fibras nerviosas en degeneración Walleriana son intensamente positivas (Fig. 8). La inmunorreacción es más marcada en la periferia de las vacuolas degenerativas y sobre todo en los acúmulos perinucleares de citoplasma visibles en cortes tangenciales de la superficie de la célula de Schwann (Fig. 8).

Lisozima:

Los macrófagos espumosos son muy abundantes en la zona de la lesión y se localizan entre las células de los cordones de Büngner. Todas estas células muestran citoplasmas con inmunorreacción positiva granular para este antígeno (Fig. 9). En la vecindad de vasos dilatados cercanos a la zona de lesión aparecen asimismo células espumosas positivas de núcleo esférico pequeño. Los polimorfonucleares extravasados, o en el interior de las luces vasculares, distinguibles morfológicamente por su núcleo polilobulado, también presentan positividad granular citoplasmática.

Las células de Schwann del cabo proximal, los cordones de Büngner de la zona de la lesión y las células de Schwann en degeneración ovoidea del cabo distal son totalmente negativas a este marcador (Fig. 10). Esta negatividad contrasta con las células espumosas positivas, presentes exclusivamente en la zona de la lesión, alineados junto a las fibras nerviosas en degeneración Walleriana.

En el cabo distal, estudiado a un centímetro de la zona de la lesión, no aparecen células positivas exceptuando algún polimorfonuclear intravascular. Morfológicamente tampoco aparecen células espumosas en este segmento.

Neurofilamentos:

En la zona de la lesión, se observan tramos longitudinales de grosor variable, teñidos intensamente, que corresponden claramente a los segmentos axónicos en vías de degeneración en el interior de las células de Schwann (Fig. 11). Con frecuencia se observan partículas positivas granulares en el seno del citoplasma de células espumosas dispuestas en hilera, aparentemente en posición endoneural, así como entre medias de fibras nerviosas en degeneración.

En el cabo distal, la mayor parte de las células de Schwann contienen tramos positivos de distinto grosor y longitud (Fig. 12), no apreciándose células espumosas con material positivo en el citoplasma.

DISCUSION

La lesión traumática experimental del nervio ciático de rata, conlleva, cinco días tras la operación, la aparición en la zona de compresión, de numerosas células espumosas con características macrofágicas. El origen y naturaleza de estas células todavía es motivo de discusión.

Las distintas poblaciones de macrófagos que constituyen el Sistema Mononuclear Fagocítico se distinguen muy difícilmente entre sí por criterios morfológicos (29). La identificación es prácticamente imposible cuando los macrófagos están estimulados y fagocitan activamente.

Las técnicas inmunocitoquímicas permiten detectar de modo muy selectivo y específico, determinantes antigénicos presentes en las células y los tejidos (33). Algunos de estos antígenos son muy característicos de células presentes en los nervios normales y pueden utilizarse en la identificación de células en los nervios en degeneración postraumática.

La vimentina es una subunidad proteica de 57000 D, correspondiente a filamentos de ta-

maño intermedio (8-10 nm), presente en diversas células (2, 12, 30), incluidas las células de Schwann de los nervios periféricos normales (1) y los leucocitos sanguíneos (13). Por este motivo puede ser utilizado como marcador genérico de macrófagos y de células de Schwann en el estudio inmunocitoquímico de la degeneración Walleriana.

La proteína S-100 corresponde a la subunidad proteica extraída del encéfalo de bóvidos (24), aparentemente involucrada en el transporte transmembránico de calcio (3). Esta proteína, a pesar de encontrarse en células de distintos tejidos normales (33), se considera muy característica de células de Schwann de nervios periféricos (18, 19, 32) y nunca se ha descrito en células leucocitarias.

La proteína ácida gliofibrilar forma parte de los filamentos intermedios (27) y es característica de células gliales del Sistema Nervioso Central (10). Este marcador se ha descrito asimismo en células de Schwann de nervios periféricos normales, mielínicos y amielínicos (1, 7, 11) así como en nervios en degeneración Walleriana (5, 7). Su distribución en el nervio periférico es por tanto completamente superponible a la de la proteína S-100, aunque su presencia es altamente específica de células gliales.

La lisozima es un enzima bactericida lisosómico característico de células derivadas de la médula ósea, particularmente abundante en monocitos (6, 20, 22, 28). Este enzima nunca se ha descrito en células de Schwann de nervios periféricos normales, ni activadas de nervios en degeneración Walleriana o en regeneración.

Las células espumosas se han detectado morfológicamente y por métodos inmunocitoquímicos, siete días tras la operación, sólo en la zona de la lesión, apreciándose una distribución muy superponible por ambos métodos. Inmunocitoquímicamente, estas células presentan un patrón de tinción característico de macrófagos hematógenos (lisozima + vimentina +), resultando negativos para marcadores de células de Schwann (S-100 - GFAP -). También por métodos de inmunolocalización hemos podido confirmar la ausencia de este tipo de macrófagos a lo largo del cabo distal.

Los macrófagos residentes, en los tejidos de cualquier órgano, pueden tener un origen a partir de células monocitárias circulantes (23), y en este caso pueden conservar la actividad lisozima (23). En este caso, con los métodos empleados, resulta imposible delimitar ambas poblaciones. Sin embargo, los macrófagos residentes del endoneuro de un nervio normal representan aproximadamente menos de un 1% del total de células (25, 31). Diversos autores indican la imposibilidad de división mitótica de estas células. Nosotros no hemos podido encontrar figuras mitóticas de células espumosas y las mitosis presentes pertenecen a las células de Schwann de los cordones de Büngner dada su disposición paralela al eje mayor del nervio y la tinción del citoplasma de las células con marcadores propios de células de Schwann. Estudios realizados en nervios degenerados en cámaras semipermeables implantadas en el peritoneo indican que la participación de los macrófagos endoneurales es menoscupable (4).

Diversos autores propugnan la capacidad fagocítica de las células de Schwann (5, 21), e incluso su transformación en macrófagos (8), en la degeneración Walleriana de los nervios periféricos. Sin embargo, estudios ultraestructurales indican que la pérdida de la vitalidad del axón conduce a la activación de las células de Schwann quiescentes del nervio normal, que expulsan el cilindro de mielina con el segmento de axón correspondiente (15, 16, 26).

El cultivo *in vivo* (4, 31), de nervios degenerados en implantes peritoneales, las células de Schwann se comportan de modo análogo y persisten viables. Los cilindros de mielina expulsados sólo sufren cambios compatibles con la degeneración Walleriana clásica cuando se utilizaron como barrera membranas semipermeables cuyo poro permite la entrada de macrófagos peritoneales. Por tanto, parece imprescindible la intervención de macrófagos exógenos para conseguir la degradación y eliminación de los segmentos axónicos y la vaina de mielina.

Nosotros, con nuestro estudio inmunocitoquímico, demostramos que las células de Schwann quiescentes o activadas nunca contienen lisozima, utilizado como marcador característico de macrófagos hematógenos y sí otros como las proteínas S-100, la proteína

ácida gliofibrilar y la vimentina. Los macrófagos tisulares pueden tener un origen a partir de células monocitarias y en ese caso pueden conservar la actividad lisozima (23). Todas las células espumosas, son identificadas como macrófagos por su actividad lisozima y vimentina. Por los motivos razonados anteriormente, la mayoría deben corresponder a macrófagos exudativos derivados de monocitos circulantes y sólo algunos pueden derivar de macrófagos residentes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AUTILIO-GAMBETTI, L.; SIPPLE, J.; SUDILOVSKY, O. and GAMBETTI, P. (1982): Intermediate filaments of Schwann cells. *J. Neurochem.*, 38: 774-780.
- 2.- BANKS-SCHLEGEL, S.P.; GAZDAR, A.F. and HARRIS, C.C. (1985): Intermediate filaments and cross linked envelope expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res.*, 45: 1187-1197.
- 3.- BAUDIER, J.; TYRZYK, J.; IOFROTH, J.E. and LIANOS, P. (1984): A subnanosecond pulse fluorometric study of Ca and Mg induced conformational changes on S-100 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(3): 959-965.
- 4.- BEUCHE, W. and FRIEDE, R.L. (1984): The role of non-resident macrophages in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.*, 13: 767-796.
- 5.- BLÜMCKE, S. and NIEDORF, H. (1966): Electron microscope studies of Schwann cells during Wallerian degeneration with special reference to the cytoplasmic filaments. *Acta Neuropathol.*, 6: 46-60.
- 6.- BRAUNHUT, S.J.; BLANC, W.A.; RAMANARAYANAN, M.; MARBOE, C. and MESA-TEJADA, T. (1984): Immunocytochemical localization of lysozyme and alpha-1-antichymotrypsin in the term human placenta. *J. Histochem. Cytochem.*, 32(11): 1204-1210.
- 7.- DAHL, D.; CHI, N.H.; MILES, L.E.; NGUYEN, B.T. and BIGNAMI, A. (1982): Glial fibrillary acidic protein in Schwann cells: fact of artifact?. *J. Histochem. Cytochem.*, 30(9): 912-918.
- 8.- DANKWART, S.; KATEKAMP, D. and FRITZSCHE, V. (1978): Ultrastructural relations of macrophages to Schwann cells. *Exp. Pathol. (Bd)*, 16; S. 16-22.
- 9.- DAVISON, P.F. and JONES, R.N. (1981): Filament proteins in central, cranial and peripheral mammalian nerves. *J. Cell Biol.*, 88: 67-72.
- 10.- ENG, L.F. (1985): Glial fibrillary acidic protein (GFAP). The major protein of glial intermediate filaments in differentiate: astrocytes. *J. Neuroimmunol.*, 8: 203-214.
- 11.- FIELDS, K.L. and McMENAMIN, P. (1985): Schwann cells cultured from adult rats contain a cytoskeletal protein related to astrocyte filaments. *Develop. Brain Res.*, 20: 259-269.
- 12.- FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; OSBORN, M. and WEBER, K. (1978): Different intermediate sized filament distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5034-5038.
- 13.- FRANKE, W.W.; SCHMID, W.; WINTER, S.; OSBORN, M. and WEBER, K. (1979): Widespread occurrence of intermediate sized filaments of vimentin type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp. Cell Res.*, 123: 25-46.
- 14.- HAIMOTO, H.; HOSODA, S. and KATO, K. (1987): Differential distribution of immunoreactive S-100 alpha and S-100 beta proteins in normal non-nervous human tissues. *Lab. Invest.*, 57: 489-498.
- 15.- IDE, C. (1983): Nerve regeneration and Schwann cell basal lamina. Observation of the long-term regeneration. *Arch. Histol. Jap.*, 46: 243-257.
- 16.- IDE, C.; TOHYAMA, K.; YOKOTA, R.; NITATORI, T. and ONODER, S. (1983): Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.*, 288: 61-75.
- 17.- JESSEN, K.B.; THORPE, R. and MIRSKY, R. (1984): Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein. An immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, enteric glia and astrocytes. *J. Neurocytol.*, 13: 180-200.
- 18.- KAHN, H.J.; MARKS, A. and THOM, H. (1983): Role of antibody to S-100 protein in diagnostic pathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 79: 341-346.
- 19.- KAHN, H.J.; BAUMAL, R. and MARKS, A. (1984): The value of immunohistochemical studies using antibody to S-100 protein in dermatopathology. *Int. J. Dermatol.*, 23: 38-44.
- 20.- MASON, D.Y. and TAYLOR, C.R. (1975): The distribution of muramidase (lysozyme) human tissues. *J. Clin. Pathol.*, 28: 124-132.
- 21.- MEADOR-WOODRUFF, J.H.; YOSHIMO, J.E.; BIGBEE, J.W.; LEWIS, B.L. and DEVRIES, G.H. (1985): Differential proliferative responses of cultured Schwann cells to axolemma and myelin-enriched fractions. II. Morphological studies. *J. Neurocytol.*, 14: 619-635.
- 22.- MENDELSON, G.; EGGLESTON, J.C. and MANN, R.B. (1980): Relationship of lysozyme (muramidase), to histiocytic differentiation in malignant histiocytosis. An immunohistochemical study. *Cancer*, 45: 273-279.
- 23.- MIYAUCHI, J.; SASADAIRA, H.; WATANABE, R. and WATANABE, Y. (1985): Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in human monocytes and macrophages. *Cell Tissue Res.*, 242: 269-277.
- 24.- MOORE, B.W. (1972): Chemistry and biology of two proteins S-100 and 14.3.2, specific to the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.*, 15: 215-225.
- 25.- OLDFORS, A. (1980): Macrophages in peripheral nerves. An ultrastructural and enzyme histochemical study on rats. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 49: 43-49.
- 26.- OSAWA, T.; IDE, C. and TOHYAMA, K. (1987): Nerve regeneration through cryotreated xenogeneic nerve grafts. *Arch. Histol. Jap.*, 50 (2): 193-208.
- 27.- OSBORN, M. and WEBER, K. (1983): Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing. A novel tool for surgical pathology. *Lab. Invest.*, 48(4): 372-394.
- 28.- PINKUS, G.S. and SAID, J.W. (1977): Profile of intracytoplasmic lysozyme in normal tissues, myeloproliferate disorders, hairy cell leukemia and another pathologic processes. An immunoperoxidase study of paraffin sections and smears. *Am. J. Pathol.*, 98: 351-366.
- 29.- RADZUN, H.J. and PARWARESCH, M.R. (1983): Differential immunohistochemical resolution of the human mononuclear phagocyte system. *Cell Immunol.*, 82: 174-183.
- 30.- RAMAEKERS, F.C.S.; HANG, D.; KANT, A.; MOESKER, O.; JAP, P.H.K. and VOOIJIS, G.P. (1983): Coexpression of keratin and vimentin type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. Cell Biol.*, 80: 2618-2622.
- 31.- SCHUBERT, T. and FRIEDE, R.L. (1981): The role of endoneurial fibroblasts in myelin degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 40: 134-154.
- 32.- SHEARMAN, J.D. and FRANKS, A.J. (1987): S-100 protein in Schwann cells of the developing human peripheral nerve. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 249: 459-463.
- 33.- TAYLOR, C.R. (1986): Appendix III. In: *Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. Major Problems in Pathology. Vol. 19. Saunders Co.*
- 34.- YEN, S. and FIELDS, K.L. (1981): Antibodies to neurofilaments, glial filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *J. Cell Biol.*, 88: 115-126.

Correspondencia: Prof. Dr. D. Jesus Boya Vegue. Departamento de Histología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. 28040 Madrid.