

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**ALOINMUNOTRASPLANTE DE NERVIOS PERIFÉRICOS
TRATADO CON FK-506**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Díez de Angulo

Bajo la dirección de los doctores

Jaime Arias Pérez

José A. de Pedro Moro

Madrid, 1997

ISBN: 84-669-2398-5

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



* 5 3 0 9 8 3 7 2 7 5 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

*ALOINMUNOTRASPLANTE DE NERVIO PERIFERICO
TRATADO CON FK-506*

TESIS DOCTORAL



ARCHIVO

MARTA DIEZ DE ANGULO

Madrid-Septiembre-1997

TESIS DOCTORAL

**ALOI NMUNOTRASPLANTE DE NERVIO PERIFERICO
TRATADO CON FK-506**

Realizada por:

DOÑA MARTA DIEZ DE ANGULO

Dirigida por:

PROF. DR. D. JAIME ARIAS PEREZ
CATEDRATICO DE CIRUGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Codirigida por:

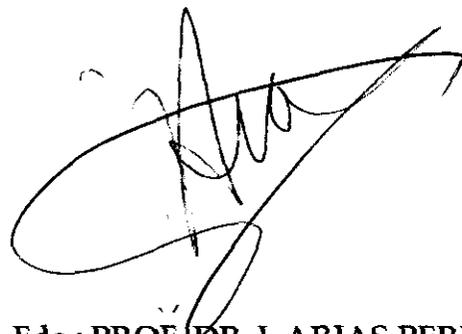
DR. D. JOSEA. DE PEDROMORO
PROFESOR ASOCIADO DE CIRUGIA DEL HOSPITAL CLINICO SAN
CARLOS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MADRID, Septiembre de 1997

D. JAIME ARIAS PEREZ, CATEDRATICO DE CIRUGIA DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que Doña MARTA DIEZDEANGULO, ha realizado bajo mi Dirección el trabajo de Investigación:
Aloinmunotrasplante de nervio periférico tratado con FK-506, durante los años 1989-1997. Examinado y revisado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa para ser juzgado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Madrid a Quince de Septiembre de 1997.

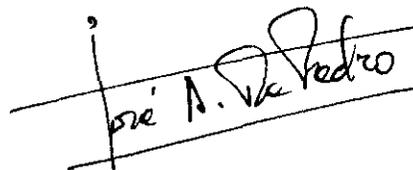
A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JAIME ARIAS PEREZ', written in a cursive style with a large loop at the end.

Fdo.: PROF. DR. J. ARIAS PEREZ

D. JOSE A. DE PEDRO MORO, PROFESOR ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DEL HOSPITAL CLINICO SAN CARLOS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que Doña MARTA DIEZ DE ANGULO, ha realizado bajo mi Codirección el trabajo experimental titulado: *Aloinmunotrasplante de nervio periférico tratado con FK-506*. Examinado y corregido dicho estudio, doy mi conformidad para su presentación y defensa para ser juzgado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Madrid a Quince de Septiembre de 1997.

A handwritten signature in black ink, written over two horizontal lines. The signature is cursive and reads "José A. de Pedro Moro".

Fdo.: DR. J. A. DE PEDRO MORO

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La reparación de grandes defectos nerviosos periféricos supone con frecuencia un reto para el cirujano moderno. Bien sea por causas postraumáticas o resecciones tumorales, es relativamente frecuente la necesidad de disponer de longitudes suficientes de nervio periférico para dar continuidad al impulso nervioso. En el presente estudio se ha evaluado un nuevo fármaco inmunosupresor en el trasplante de nervio periférico en ratas con barrera de histocompatibilidad alta. Se pretende extender la utilidad del fármaco al banco de tejidos, obviando los problemas de efectos secundarios y rechazo, ya demostrados en el trasplante de órganos. Se ha incorporado como métodos de análisis la electrofisiología mediante registro de impulsos en tren a cuatro y el análisis de imagen morfométrico.

Vº Bº
EL TUTOR (2)
El Codirector de la Tesis



Fdo.: JOSE A. DE PEDRO MORO
(Fecha y firma)
5-MAYO-1997
DNI 7814087-K

El Director de la Tesis



Fdo.: JAIME ARIAS PEREZ
(Fecha y firma)
5-MAYO-1997
DNI

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "ALOINMUNOTRASPLANTE DE NERVIO PERIFERICO TRATADO CON FK-506", realizada por Da Marta Díez de Angulo, ha sido considerada por el Consejo de Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador

Fecha reunión
Consejo Departamento
14 de mayo de 1997

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J. L. Balibrea
(Fecha y firma)

22-9-97

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. J. Arias Pérez, cuya experiencia en el campo experimental y dedicación a la universidad han hecho posible la iniciación de este trabajo.

Al Prof. J.A. de Pedro Moro, sin cuya ayuda, experiencia y optimismo constantes nunca se hubiera podido realizar esta tesis.

Al Dr Pérez-Caballer, predecesor en esta línea de investigación, por su amistad y por su colaboración y ayuda permanentes durante todo este tiempo.

Al Dr López Bravo, Dra Corcuera y Raquel Grajera por la supervisión y colaboración prestadas en el estudio morfométrico e inmunohistoquímico.

A los Dres J. Hurtado, R. López- Casero y D. Tomás por su asesoramiento directo en la realización del trasplante nervioso, a la Dra Cuadrado por su colaboración en el tratamiento estadístico y al Dr L. Quecedo por su ayuda desinteresada en el campo informático.

Al Prof. H. Durán Sacristán, a quien debo mis primeros contactos con la Cirugía y el haber aprendido a vivir la universidad.

A los Dres Arnold, Alía, Pérez-Contín, Domínguez Esteban, Hernández Soto, Vicente López, Gómez Serrano, Pérez Cano, Galiano, Marín Palomo, Milla, Marañés, Díaz, Moreno López, Toledano, Martínez Panadero, Sanz Continente y Leo, Cabezudo, Fernández Galván, Lizasoain y Plaza, por su amistad y por haberme transmitido su ánimo durante el largo tiempo que duró la realización de este trabajo.

A Pablo Martínez, cuya colaboración y experiencia veterinaria me permitió introducirme en el manejo de esos encantadores animales que son los roedores.

Al laboratorio Fujisawa, que desde Osaka (Japón) y gracias a la colaboración de Pilar Sanchez, suministró el fármaco FK506 con el que se ha podido llevar a cabo esta Tesis.

Al personal del servicio de documentación científica de Glaxo Wellcome y a Manuel Espantaleón de la biblioteca del Hospital Clínico de Madrid por su contribución en las reiteradas búsquedas bibliográficas que han sido necesarias para completar este trabajo.

A la casa Serotec (Atom) y a la ortopedia Juan Bravo 71, por su participación en la obtención de material inunohistoquímico y animales utilizados en este estudio.

A todo el personal y compañeros del C.S. Castillo de Uclés por su interés y por su ánimo permanentes. A mis amigos, a mis padres y a mis hermanos, que vivieron de cerca todas las dificultades e interminables días hasta que esto tocó a su fin, especialmente a mi hermano Carlos que con paciencia consiguió introducirme en este complicado mundo de la informática.

A Gonzalo, por su confianza permanente y porque siempre me animó a continuar adelante.

DEDICATORIA

A todos los que os asomáis a estas páginas buscando empezar vuestra tesis, para que nunca os falte la constancia, el trabajo y el ánimo necesarios para terminar con éxito lo que hoy empezáis con tanta ilusión.

INDICE**PAG****I.- INTRODUCCION**

1.- Planteamiento del problema.....	1
2.- Introducción histórica.....	3
2.a.- Trasplante de tejidos.....	3
2.b.- Cirugía del nervio periférico.....	6
2.c.- FK-506.....	11
3.- Histología del nervio periférico.....	13
3.a.- Anatomía del nervio ciático en el hombre.....	13
3.b.- Estructura microscópica del nervio periférico.....	14
3.c.- Proceso de degeneración del nervio periférico.....	18
3.d.- Proceso de regeneración del nervio periférico.....	19
3.e.- Regeneración de los nervios unidos por medios quirúrgicos.....	20
4.- Histología del aloinjerto de nervio periférico y del rechazo postrasplante.....	24
5.- Rechazo del trasplante.....	30
5.a.- Terminología del trasplante.....	30
5.b.- Fisiopatología del rechazo.....	33
5.c.- Inmunología del rechazo.....	34
5.c.1.- Antígenos de trasplante o de histocompatibilidad.....	34
5.c.2.- Reconocimiento antigénico.....	36
5.c.3.- Centros linfoides.....	37

5.c.4.- Elaboración de la respuesta inmunológica....	39
5.c.5.- Mecanismo efector de la respuesta inmunológica.....	41
5.d.- Tipos de rechazo.....	43
5.e.- Prevención y tratamiento del rechazo.....	43
6.- FK-506.....	44
6.a.- Aislamiento y síntesis.....	44
6.b.- Propiedades fisicoquímicas y biológicas.....	45
6.c.- Propiedades farmacocinéticas.....	45
6.d.- Mecanismo de acción.....	46
6.e.- Propiedades inmunológicas.....	48
6.f.- Dosis y vías de administración.....	51
6.g.- Estudios experimentales.....	54
6.h.- Experiencia clínica.....	55
6.i.- Toxicidad y efectos adversos.....	59
6.j.- Comparación de FK 506 y Cy A.....	64
7.- Estudio inmunohistoquímico de fibras nerviosas.....	68
8.- Estudio por análisis de imagen de fibras nerviosas.....	69
9.- Estudio electrofisiológico de conducción nerviosa.....	70
10.- Anatomía del nerviociático de la rata.....	71
11.- Objetivos e hipótesis de trabajo.....	72

II.- MATERIAL Y METODOS

A.-MATERIAL

1.- Animal de experimentación.....	76
---	-----------

1.a.- Dieta de mantenimiento.....	76
2.- Instalaciones.....	77
2.a.- Estabulario y condiciones de mantenimiento....	77
2.b.- Quirófano experimental.....	78
3.- Material quirúrgico.....	78
3.a.- Instrumental macroquirúrgico.....	78
3.b.- Material de microcirugía.....	78
3.b.1- Medios de magnificación.....	78
3.b.2.- Suturas.....	79
3.b.3.- Instrumental microquirúrgico.....	79
4.- FK 506.....	80
5.- Antisueros.....	81
6.- Material complementario.....	82
6.a.- Anestésicos.....	82
6.b.- Antisépticos.....	83
6.c.- Rasuradora.....	83
6.d.- Báscula.....	83
6.e.- Material iconográfico.....	83
6.f.- Talladora.....	84
6.g.- Análisis de imagen.....	84
7.- Sistema de electrofisiología.....	84

B.- METODOS

1.- Diseño del estudio Experimental.....	85
---	-----------

2.- Técnica quirúrgica.....	86
2.a.- Anestesia.....	86
2.b.- Colocación del animal.....	86
2.c.- Asepsia.....	86
2.d.- Técnica quirúrgica.....	87
3.- Estudio electrofisiológico del nervio ciático.....	88
4.- Sacrificio de los animales y obtención de muestras.	90
4.a.- Estudio inmunohistoquímico del nervio ciático.....	90
4.b.- Estudio morfométrico del nervio ciático.....	91
5.- Procesamiento de las muestras de nervio ciático...	91
5.a.- Estudio histológico a microscopía óptica convencional.....	91
5.b.- Estudio inmunohistoquímico del nervio ciático.....	92
5.c.- Estudio morfométrico del nervio ciático.....	96
6.- Tratamiento estadístico.....	99

III.- RESULTADOS

1.- Resultados del estudio a microscopía óptica.....	101
2.- Resultados del estudio inmunohistoquímico.....	101
2.a.- Localización inmunohistoquímica de Timocitos y células T.....	101
2.b.- Localización inmunohistoquímica de células T citotóxicas (CD 8).....	102
2.c.- Localización inmunohistoquímica de células T helper (CD 4).....	103
2.d.- Localización inmunohistoquímica de macrófagos y células dendríticas.....	103
2.e.- Localización inmunohistoquímica del CMH-Clase I (Ag RT1Aa de rata).....	104

2.f.- Localización inmunohistoquímica del CMH-Clase II (Ag IaE de rata).....	105
3.- Resultados del estudio electrofisiológico.....	105
4.- Resultados del estudio morfométrico por análisis de imagen.....	106
IV.- <u>DISCUSION</u>	108
V.- <u>CONCLUSIONES</u>	127
VI.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	129

ALOINMUNOTRASPLANTE DE NERVIO PERIFERICO PRESERVADO CON FK-506

I.- INTRODUCCION

1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reparación del tejido nervioso lesionado ha sido motivo de investigación desde hace siglos.

Tras superar la idea, hace más de cien años, de que los nervios podían regenerar espontáneamente y que su manipulación podía impedir la funcionalidad del mismo, han sido numerosos los científicos que han profundizado en el estudio de la regeneración del nervio periférico.

En el pasado siglo, **Waller**²⁶² describió la degeneración de axones y mielina producida en el segmento distal de una fibra lesionada (degeneración Walleriana). En el mismo ámbito demostró el sobrecrecimiento de axones desde el extremo proximal del nervio afectado (regeneración Walleriana).

Desde entonces, numerosos y diversos métodos de tratamiento tanto conservadores como quirúrgicos han sido aplicados, no sólo a nivel experimental sino también en la práctica clínica, obteniéndose con todos ellos un importante avance en el conocimiento de este tema, **Mackinnon**¹⁵⁷.

Así, se sabe que en una fibra nerviosa lesionada sólo existirá regeneración de la misma si el soma celular permanece intacto. Posteriormente, del extremo proximal seccionado, habrán de nacer nuevas ramas en longitud y diámetro, en dirección al extremo seccionado distal para crear nuevas conexiones sinápticas, restableciéndose así la continuidad de la fibra y su funcionalidad.

Según estos conocimientos, puede lograrse la restauración de la fibra nerviosa lesionada, para lo cual debe procurarse un adecuado y cuidadoso

manejo del tejido, según refiere **Mackinnon**¹⁵⁸, que destaca entre los principios básicos en el manejo del nervio periférico, los siguientes:

1.- Cualquier reparación nerviosa ha de hacerse siempre "libre de tensión", ya que lo contrario producirá un incremento del grado de fibrosis en la línea de sutura, lo que reportará una disminución de su funcionalidad.

2.- Es importante mantener una correcta alineación y enfrentamiento de los fascículos nerviosos con el fin de evitar la formación de neuromas en la zona de unión, que afecten a la transmisión nerviosa.

3.- En el caso de que la lesión sea extensa y no pueda hacerse una reparación sin tensión, será necesario interponer un material que sustente o sirva de estructura para facilitar la regeneración de las fibras guiándolas hasta el segmento distal.

Estos experimentos han demostrado que tanto el neurotrofismo (capacidad de influir sobre la maduración de la fibra nerviosa), como el neurotropismo (capacidad de influir sobre la dirección de su crecimiento), juegan un papel importante en el campo de la reparación nerviosa, cuyo ideal sería optimizar al máximo los efectos de ambos, **Dellon**⁴⁷.

Esta capacidad de "crecimiento dirigido" de la fibra nerviosa ha suscitado una repetida búsqueda de diversos materiales y tejidos, que interpuestos entre las fibras, sirvan de estructura para su elongación. En esta línea, se pretende realizar este trabajo empleando como material de unión un aloinjerto nervioso, que ya otros autores establecieron como estructura ideal para regenerar lesiones en este tejido, **Singh**²²⁷.

Dado que el mayor obstáculo para que la reparación se lleve a cabo es la respuesta inmune de rechazo que el propio organismo desencadena frente al huésped antigénicamente distinto, hemos querido estudiar la influencia del fármaco inmunosupresor FK 506, de probada eficacia en trasplantes de riñón, hígado, pulmón y corazón.

La efectividad del fármaco ha sido valorada en base a los resultados obtenidos mediante:

1.- Estudio inmunohistoquímico, que permite la identificación del patrón celular implicado en la reacción de rechazo, y su modificación al aplicar el fármaco inmunodepresor.

2.- Estudio morfométrico de la densidad de fibras nerviosas regeneradas bajo la influencia del fármaco.

3.- Electroestimulación de la fibra nerviosa regenerada, verificando la recuperación de su funcionalidad.

Para establecer el tiempo de duración del experimento en orden a obtener regeneración nerviosa, se ha decidido emplear dos tiempos de 5 y 11 semanas para valorar comparativamente el progresivo crecimiento de fibras, teniendo en cuenta, según estudios previos de diversos autores, **Ishida**¹¹⁴, **Kuroki**¹⁴², **Mackinnon**¹⁵⁹, que antes de este tiempo la regeneración es mínima.

2.- INTRODUCCION HISTORICA

2.a- TRASPLANTE DE TEJIDOS

La historia de los trasplantes de tejidos puede dividirse en tres grandes épocas:

1.- Epoca empírica, que comprende desde las culturas antiguas hasta el siglo XX.

2.- Epoca racional, que abarca el periodo de tiempo comprendido entre los primeros trasplantes realizados por *Carrel y Ullman* y el descubrimiento de la naturaleza inmunológica del rechazo de aloinjerto por **Medawar**¹⁶⁹.

3.- Epoca científica, que abarca desde la Segunda Guerra Mundial hasta la actualidad.

La época científica de los trasplantes comienza en el siglo actual en el cual, el desarrollo de las técnicas de sutura vascular, gracias a los trabajos de *Guthrie y Carrel*, supuso un importante avance para la técnica quirúrgica de los trasplantes. Por otro lado, el descubrimiento de los grupos sanguíneos en 1901 por *Landsteiner* (sistema ABO) no sólo permitió introducir la transfusión sanguínea en la práctica quirúrgica, sino estudiar también las diferencias y similitudes tisulares y celulares.

En 1903, se empezó a entrever la importancia de la genética en este campo, aspecto corroborado en 1907 por *Borrel* con trasplantes de tumores experimentales entre hermanos, y por *Little* en 1914, al comprobar que la aceptación del tumor por el receptor es más probable si tiene factores de susceptibilidad idénticos a los del donante.

En 1938, *Gorer* describió los isoanticuerpos como reacción del organismo a los isoantígenos genéticamente determinados, que se encuentran en los tejidos normales y tumorales. Posteriormente, con *Lyman y Snell*, describió el locus H-2, que rige el sistema principal de histocompatibilidad en el ratón.

En 1943, **Medawar**¹⁶⁹ sentó las bases inmunológicas de la reacción de rechazo, siendo de extraordinaria importancia en este campo la experiencia conjunta con *Billingham y Brent* que les llevó al descubrimiento del principio de la tolerancia inmunológica.

En los años cincuenta, se pusieron en práctica una serie de procedimientos para debilitar o anular el rechazo de los trasplantes como fueron la irradiación corporal subletal, y la utilización de los corticoides. En 1958 *Schwartz, Stack y Dameshek* introdujeron la 6-mercaptopurina como droga inmunosupresora entre los recursos posibles para inhibir el rechazo, lo que constituyó la base de la inmunodepresión con fármacos.

En 1953, *Foley* descubrió los antígenos tumorales específicos, y en 1954, *Mitchison* demostró brillantemente la posibilidad de transferir la sensibilización a aloinjertos de tumores sólidos mediante linfocitos

procedentes de animales que habían rechazado previamente el mismo tumor sólido (inmunidad adquirida adoptiva).

La reacción "injerto contra huésped" fué descrita por *Simonsen* en 1957. Como consecuencia de esta reacción las células inmunocompetentes del donante pueden determinar la muerte del receptor.

*Dausset*⁴⁴ en 1958, descubrió los antígenos leucocitarios (sistema HLA), lo que ha permitido seleccionar los donantes y elegir los receptores más adecuados, buscando una menor reacción de rechazo, para recibir un trasplante.

Rosenau en 1963, describió la capacidad citolítica in vitro de los linfocitos sensibilizados. En 1964, *Bain* estudió el "cultivo mixto de linfocitos" procedentes de individuos no emparentados, que conducía a la aparición de grandes células blásticas proliferantes.

Durante 1963 y 1964 destacan los estudios de *Woodruff y Anderson* sobre el suero antilinfocítico heterólogo como agente de inmunosupresión, sustituido unos años después por globulina antilinfocítica.

Los estudios de *Miller* durante los años 1960, por lo que respecta a la función del timo como órgano linfoide central, son hoy clásicos.

En cuanto a los trasplantes clínicos de órganos, han ido sucediéndose con resultados variables a lo largo de nuestro siglo. Así, en 1906 *Zirm* lleva a cabo el primer homotrasplante de córnea humana y en 1950, *Merril y Hume* comienzan a realizar los primeros trasplantes renales siendo en la actualidad los más conocidos y experimentados.

En otro campo, *Mathé* en 1955 realiza el primer trasplante de médula ósea, siendo el primer trasplante de hígado realizado en Estados Unidos en 1963, por *Starzl*²²⁹ y en Europa, dos años después, por *Calne*²⁷.

El primer trasplante pancreático humano realizado por *Kelly y Lillehei* se consigue en 1966, mientras que el de pulmón se llevó a cabo por primera vez en 1963 por *Hardy*.

Barnard fué el autor del primer trasplante cardiaco humano en 1967 y en el mismo año *Lillehei* lleva a cabo, aunque no con el mismo éxito, el primer trasplante intestinal.

Desde la Segunda Guerra Mundial hasta nuestros días se están perfeccionando las técnicas quirúrgicas necesarias para llevar a cabo con éxito el trasplante de órganos y tejidos. Se están estudiando y proponiendo procedimientos encaminados a disminuir o hacer desaparecer el rechazo del órgano trasplantado. Se están perfeccionando los sistemas de conservación de órganos y se está ampliando el conocimiento de los antígenos de histocompatibilidad.

Entre las adquisiciones más recientes de esta etapa debe destacarse el empleo de la ciclosporina A (CyA), introducida en la clínica humana en 1978 por **Calne**²⁸, y el empleo de anticuerpos monoclonales como agentes inmunosupresores. Ambos han sido responsables de una neta mejoría en el resultado de los trasplantes en los últimos años. Otras drogas introducidas más recientemente han sido la OKT-3 y el FK 506, así como la solución de Wisconsin como solución de preservación del injerto, **Martinez**¹⁶².

2.b.- CIRUGIA DEL NERVIO PERIFERICO

Históricamente, y siguiendo las pautas marcadas por *Galeno*, durante siglos, los cirujanos que se encontraban ante un nervio periférico seccionado, evitaban cualquier intento de reparación, e incluso convertían las secciones parciales en totales, para evitar la aparición de "convulsiones", **Irisarri**¹¹¹.

Esta actitud generalizada no impidió que algún cirujano efectuase y describiese intentos aislados de reparación. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se comenzó a aceptar la reparación de un nervio periférico seccionado, mediante la sutura de su tejido conjuntivo.

El objetivo de esta etapa, que podríamos llamar "era mecánica", era conseguir el afrontamiento más exacto posible entre los extremos del nervio seccionado. Muchos cirujanos, como *Schiff* en 1851, llegaron incluso a pensar, de forma errónea, que si esta reparación se efectuaba de urgencia, se produciría una cicatrización "primaria", evitándose así el proceso de degeneración walleriana del segmento distal, **Waller**²⁶².

En 1863, *Philipeaux y Vulpian* publicaron un artículo en el que describían la realización del primer aloinjerto nervioso en perros cuyo fracaso les llevó a continuar la línea del trasplante utilizando injertos autólogos, **Dellon**⁴⁷.

Durante el último siglo, se produce un avance significativo en el desarrollo de la cirugía del nervio periférico, basado en la aplicación de técnicas que ya habían sido perfiladas con anterioridad y que pudieron emplearse en el tratamiento de un importante número de traumatismos del nervio periférico producidos durante la segunda guerra mundial. Cirujanos ingleses como **Seddon**²¹⁸ y **Yahr**²⁷⁴ entre otros, desarrollaron las reparaciones tempranas del nervio periférico defendiendo como más prometedora la técnica de reparación nerviosa de tipo epineural frente a la perineural.

Respecto a la cirugía del trasplante nervioso ya en nuestro siglo, podemos citar a **Barnes**¹¹ como uno de los pioneros de la terapia en humanos ya en 1946. Previamente, **Guttman**⁹³, en 1942 y **Seddon**²¹⁷, en 1943, tras realizar experimentos en humanos y animales con homotrasplantes, concluyeron que el límite para obtener la viabilidad de un injerto nervioso estaba en 30 mm. de longitud. En relación a esto, **Mackinnon**¹⁵⁹, defendió el fenómeno de rechazo, en injertos de mayor longitud, como responsable del fallo de un aloinjerto nervioso, el cual mostraba una reacción inflamatoria difusa y una fibrosis secundaria, que fueron atribuidas a una reacción inmune del tejido huésped. Con anterioridad, **Hubbel**¹⁰⁷, en sus experimentos clásicos, había definido el autoinjerto como material ideal para el trasplante.

Diferentes técnicas en la práctica del trasplante nervioso fueron utilizadas con distinta aceptación entre los cirujanos de nuestro tiempo. Así **Seddon**²¹⁸, diseñó el uso de injertos tipo cable, en el que varios

segmentos de un nervio cutáneo unidos entre sí por diferentes métodos formaban un cable de la misma talla que el nervio a reparar, técnica que como señala **Smith**²²⁸, no llegó a ser muy popular, llevándose a cabo muy pocos casos en varios años.

Ante situaciones donde por la magnitud del defecto nervioso se hacía necesario el aporte de aloinjerto nervioso, se puso de manifiesto la necesidad de disminuir la capacidad antigénica del mismo, teniendo en cuenta que la experiencia en el uso de aloinjertos frescos no fué en principio exitosa. En el año 1943, con **Weiss**²⁶⁵, se iniciaron las primeras técnicas de preservación de aloinjertos mediante el uso de la liofilización. Años después, **Marmor**¹⁶¹, utiliza la irradiación previa y **Afanasieff**⁴, más tarde, aloinjertos preservados en solución de cialita.

La importancia de conseguir una reparación nerviosa en una intervención inicial, se basa en que la retracción de los extremos del nervio es mínima, lo que facilita la sutura sin tensión. Esto a su vez facilita el aporte vascular necesario para su correcta regeneración. Sin embargo, si no se dan las condiciones adecuadas (herida muy contaminada), es preferible recurrir a la reparación secundaria, en un plazo comprendido entre la segunda y tercera semana, según refiere **Irisarri**¹¹¹.

Tras los estudios sistematizados de **Nicholson**¹⁸³ en 1947, se estableció en torno a los 5-8 cm la distancia crítica de resección que permitía una posterior sutura término-terminal sin necesidad de injerto nervioso. La preparación de los extremos a suturar debe hacerse evitando manipulaciones bruscas de los mismos y evitando aislar los extremos del nervio en una longitud excesiva para no dañar su vascularización, alcanzando con ello en la actualidad, el concepto de "cirugía atraumática" su máximo sentido según refiere **Irrisari**¹¹¹ entre otros autores actuales.

La necesidad de obtener el afrontamiento más exacto entre los extremos del nervio seccionado condujo al empleo de medios de aumento que fueron de importancia capital en el desarrollo de la cirugía del nervio periférico. Así, se admite primero la utilización de lupas, introduciéndose posteriormente el microscopio quirúrgico que ya comienzan a utilizar de forma rutinaria **Jacobson**¹¹⁶, en 1960 y después

Kurtze¹⁴⁴ y **Michon**¹⁷¹ en 1964. **Lundborg**¹⁵², demostró igualmente la superioridad en los resultados de la neurorrafia con técnicas microquirúrgicas sugiriendo por otro lado la necesidad de utilizar injertos nerviosos de interposición para evitar tensión en las suturas. En este aspecto aportan sus experiencias a nivel clínico como experimental, autores clásicos como **Therkelsen**²⁴⁶ y actuales como **Adson**³.

En cuanto a la utilización de la sutura epineural frente a la perineural puede decirse que ha sido tema polémico desde los primeros intentos de reparación nerviosa. Así, autores como **Bora**¹⁹ y **Grabb**⁸⁵, en 1967 fueron defensores de la sutura perineural y otros como **Wise**²⁷¹, en 1969 prefirieron la epineural. En cualquier caso, el cirujano deberá intentar respetar la topografía intraneural al coaptar los extremos del nervio. **Sunderland**²³⁶, **Jabaley**¹¹⁵ y **Schroder**²¹⁵, contribuyeron notablemente a la identificación topográfica del nervio periférico. Entre ellos, fue **Sunderland**²³⁶ quien mostró que el nervio periférico no consiste en un conjunto de fibras nerviosas extremadamente juntas, sino que existe en todos los casos un elemento conectivo que contribuye en un 60% del espesor total del nervio dependiendo del patrón fascicular del mismo.

Una vez suturado el nervio, la aparición de importante formación cicatricial en los extremos nerviosos llevó a **Stookey**²³⁵ y **Millesi**¹⁷⁵ a la necesidad de reseca el extremo de sutura terminal en un segundo tiempo y llevar a cabo una anastómosis término-terminal. Diversos cirujanos como **Edshage**⁵⁹ intentaron evitar este problema intentando conseguir superficies lisas y limpias a la hora de anastomosar los terminales nerviosos. Para ello, fueron testados diferentes materiales en un intento de proteger el sitio de sutura por tubulización y en orden a impedir el crecimiento de tejido conectivo del área circundante dentro de la sutura. En este sentido, **Campbell**²⁹ y **Böhler**¹⁸ usaron Millipore como material, **Gabrielson**⁷⁸ usó Surgicel y **Midgley**¹⁷² fué el primero en utilizar tubos de silastic, al igual que **Ducker**⁵⁶ posteriormente.

Teniendo en cuenta que, cualquiera que sea el tipo de sutura empleado, es imprescindible que no haya tensión a nivel de la coaptación, se han comenzado a utilizar en nuestros tiempos nuevas posibilidades de "neurosíntesis" o yuxtaposición de los extremos del nervio, como es la utilización del láser. Este, tiene como ventajas su rapidez, la escasa

manipulación del nervio y la no utilización de un cuerpo extraño. **Almquist**⁵ utilizó el láser de Argón, para adherir al nervio unas gotas de sangre del propio paciente, que coloca previamente en la zona de coaptación, dando lugar a una masa adherida a la envoltura fascicular que mantiene coaptados los extremos. También ha sido empleado el láser de CO₂ por autores como **Terzis**²⁴⁵ y **Osedo**¹⁹¹.

Otra atractiva alternativa al uso de material de sutura es la utilización del "Sistema Adhesivo de Fibrina" (SAF), que se obtiene por la mezcla de fibrinógeno, obtenido de plasma humano, y aprotina, de origen bovino, disueltos ambos en una solución de cloruro cálcico, que se aplica mediante un dispositivo especial, obteniéndose un coágulo de óptimas características. La rapidez del método y la mínima manipulación de los extremos del nervio que se precisa, son dos importantes ventajas a las que se asocia el hecho de que la envoltura del adhesivo de fibrina, impide durante las dos primeras semanas la penetración del tejido conectivo en el área de unión, teniendo tiempo suficiente los axones para introducirse en el segmento distal antes de que se reabsorba. **Irisarri**¹¹¹, refiere haber utilizado esta técnica fundamentalmente en el caso de reimplantes complejos (amputaciones múltiples de dedos, lesiones bilaterales, etc.), por el importante ahorro de tiempo quirúrgico que supone en este tipo de intervenciones, proporcionando unos resultados equiparables a los obtenidos con la sutura convencional.

En el caso de la reparación secundaria, lo habitual es que sea necesario recurrir al injerto nervioso para poder hacer la reparación del nervio lesionado. La opinión de **Millesi**¹⁷⁵ de que el axón en vías de regeneración salvará más fácilmente dos barreras sin tensión que una sola a tensión, ha sido confirmado por los resultados de otros autores. En los casos más complejos, la coaptación del injerto se hace con un único punto de sutura de "seguridad" combinado con el empleo del SAF, según refiere **Irisarri**¹¹¹.

En los casos en los que el injerto nervioso tiene que ser colocado en un lecho mal vascularizado, se optó por el empleo de "Injertos Nerviosos Vascularizados"(INV), anastomosando la arteria y vena de su pedículo a vasos receptores de la vecindad, lo que le otorga la independencia vascular del lecho receptor. En este aspecto, fue **Taylor**²⁴⁴ el primero en utilizar la

rama sensitiva del nervio radial vascularizada por la arteria radial, como injerto para salvar una gran pérdida del nervio mediano. Sin embargo, la aplicación práctica de los INV es escasa por ser los nervios dadores nervios sensitivos con un pedículo vascular con vasos de muy pequeño calibre y con frecuentes variaciones anatómicas.

Como técnicas alternativas al injerto nervioso, se ha propuesto en la actualidad, la interposición de materiales tanto sintéticos como el ácido poliglicólico, **Mackinnon**¹⁵⁶, como no sintéticos. Entre estos últimos, cabe la posibilidad de utilizar un segmento de vaso autólogo, preferentemente venoso, **Chiu**³³, como una porción de músculo, **Glasby**⁸⁰ y **Norris**¹⁸⁵ que proporcionaría una matriz con membranas tubulares anatómica y probablemente químicamente similares a las de un nervio periférico.

En resumen, han sido muchos los cirujanos que desde los comienzos históricos hasta nuestros días han contribuido al progreso de la cirugía del nervio periférico, perfeccionando en el tiempo técnicas quirúrgicas concretas, como la neurolisis interna con **Curtis y Eversman**³⁹ y la neurorrafia con **Millesi**¹⁷⁴ y **Zoech**²⁸¹ entre otras, para hacernos entrar en los últimos años en lo que conocemos como "era biológica" de la reparación nerviosa, la cual se caracteriza por asociar medidas que puedan acelerar la regeneración axonal. Entre ellas, se ha recurrido desde al empleo de los campos electromagnéticos pulsátiles, **Raji**²⁰⁴, **Zienowitz**²⁸⁰, **Pérez-Caballer**¹⁹³, al empleo de sustancias como la triodotironina, **Forman**⁷¹, o de factores neurotróficos como el NGF o cultivos de células de Schwann, **Weinberg**²⁶⁴ e **Ikeda**¹⁰⁹. Queda con ello abierta, la posibilidad de nuevas expectativas en el campo de la cirugía del nervio periférico, asociada al esfuerzo conjunto de los especialistas en la biología del tejido nervioso, de cara a obtener un avance importante en el tratamiento de esta patología en un futuro próximo.

2.c.-FK-506

La demostración por **Calne**²⁸ en 1960 de que era posible prevenir el rechazo de un trasplante alogénico mediante la intervención farmacológica, anunció el inicio de una nueva era en el campo de la cirugía y el trasplante.

En 1961, **Calne**²⁸ consiguió trasplantar con éxito riñones entre individuos genéticamente no relacionados, mediante la utilización de una droga inmunosupresora, azatioprina, derivada de la 6-mercaptopurina que previamente habían utilizado en sus experimentos originales.

Goodwin y colaboradores, en 1963, demostraron la importancia de adicionar esteroides a las terapias inmunosupresoras, con lo que se estableció dicha asociación farmacológica como tratamiento estándar en el trasplante renal durante los veinte años siguientes. Con ello quedó patente que el éxito en el trasplante de un órgano no residía sólo en la destreza y técnicas quirúrgicas aplicadas sino también en la habilidad de manejar correctamente dichas drogas inmunosupresoras. Sin embargo, fueron muchos los trasplantes que fallaron por infecciones, debidas al exceso de inmunosupresión y por los efectos secundarios asociados a las propias drogas.

La introducción en la clínica de la Ciclosporina A (CyA) como agente inmunosupresor por **Calne**²⁸ y colaboradores, en 1979, superó las expectativas del doble régimen azatioprina-esteroides. Con ello, no sólo fueron necesarias menores dosis de esteroides sino que la propia CyA pudo ser utilizada como única droga introduciendo además el principio de selectividad farmacológica al poseer una actividad directamente contra los linfocitos T CD4 + activados. La utilización de esta droga significó una enorme expansión en el trasplante de órganos, realizados actualmente en muchos centros con éxito y de forma rutinaria. Sin embargo y desafortunadamente, la ciclosporina no está exenta de efectos secundarios, en particular su nefrotoxicidad que dificulta enormemente su manejo, especialmente en el trasplante renal.

En 1987, **Kino, Hatakana y Hashimoto**¹³², aislan en Japón un nuevo macrólido, obtenido del *Streptomyces tsukubaensis*, que posee importantes propiedades inmunosupresoras y que es denominado, utilizando la numeración y nomenclatura del laboratorio, como FK 506.

Esta droga, que desde los primeros estudios in vitro ha dejado patente su poderosa actividad inmunosupresora, utilizada en cultivos de linfocitos T helper (CD4+), ha demostrado ser aproximadamente cien

veces más potente que la CyA en inhibir selectivamente la secreción de una amplia variedad de citokinas, en particular la interleukina-2 (IL-2), **Yoshimura, Matsui y Hamashima**²⁷⁵, 1989, **Tocci, Matkovitch y Collier**²⁴⁹, 1989.

Numerosos estudios en animales han demostrado su potencia a dosis orales de 0.5-1 mg/Kg con una toxicidad que varía dependiendo de las distintas especies y de la vía de administración utilizadas. En ratas, **Ochia**¹⁸⁷ y col., administraron la droga a dosis de 0.32 mg/Kg y 1 mg/Kg obteniendo el 100% de supervivencia en trasplantes cardiacos. Sin embargo, **Liu**¹⁴⁹ refieren emanciación y una pérdida de peso del 20% en ratas tratadas con 1mg/Kg de FK 506, si bien este dato no ha sido confirmado por otros autores, **Takaya**²⁴² y col. Dosis mayores de 1-4mg/Kg , han demostrado ser responsables de hiperglucemias en ratas tratadas según refiere **Nalesnik**¹⁸².

3.- HISTOLOGIA DEL NERVIO PERIFERICO

3.a.- ANATOMIA DEL NERVIO CIATICO EN EL HOMBRE

Este nervio es el más grande del organismo. Se origina en el plexo sacro principalmente a partir de los segmentos espinales L-5 a S-2, luego abandona la pelvis posterior medialmente con respecto a la tuberosidad isquiática y discurre distalmente en la región posterior del muslo rodeado por los músculos de la corva. A lo largo de este trayecto, suministra ramas musculares a todos los músculos profundos por detrás de la articulación de la cadera y para los músculos de la corva. Todos estos músculos producen extensión del muslo siendo los de la corva también fuertes flexores de la pierna.

En el límite inferior del muslo, inmediatamente por arriba de la articulación de la rodilla, el nervio ciático se divide en dos ramas principales, el nervio tibial y el nervio peroneo común. El nervio tibial continúa distalmente en la región posterior de la pierna, ubicándose en el espacio entre la tibia y el peroné. Finalmente penetra en el lado medial del pie por detrás del maleolo interno. En este trayecto proporciona ramas sensitivas para la piel lo mismo que las ramas para todos los músculos del

dorso de la pierna, especialmente para el sóleo, el gemelo, el tibial posterior y los flexores de los dedos. Las funciones principales de estos músculos son la flexión del plantar del pie y los dedos y también la inversión del pie.

El nervio peroneo común gira alrededor del costado externo del peroné, donde se divide en los nervios peroneos superficial y profundo. El primero de estos desciende por la parte lateral de la pierna para suministrar inervación motora a los músculos peroneos e inervación cutánea al dorso del pie. El nervio peroneo profundo desciende en la región anterior de la pierna en relación con los músculos anterolaterales (el tibial anterior y los músculos extensores de los dedos) y los inerva. Su función principal es la dorsiflexión del pie.

3.b.- ESTRUCTURA MICROSCOPICA DEL NERVIO PERIFERICO

Las células de sostén del sistema nervioso periférico comprenden las células de Schwann que se asocian a todas las fibras nerviosas periféricas. Estas células, se denominan neurilemas o vainas de Schwann por la forma en que rodean a sus correspondientes axones. Todo axón del sistema nervioso periférico desde las raíces dorsales y ventrales hasta las ramificaciones más distales de las fibras sensoriales o motoras, está rodeado en la mayor parte de su longitud por una serie de células de Schwann, Weiss²⁶⁶ en 1982.

Los nervios periféricos están cubiertos por varias capas, siendo la compuesta por las células de Schwann la que se halla en más íntimo contacto con los axones.

Hacia el exterior hay tres capas de tejido conectivo. Todo el nervio se halla encerrado en un epineuro de tejido conectivo densamente fibroso, similar a una funda o manguito. Los axones de los nervios se alinean dentro del epineuro en haces o fascículos longitudinales de tamaño variable. Estos fascículos también se hallan encerrados en una funda de tejido conectivo moderadamente denso que se denomina perineuro. Los axones y sus células de Schwann correspondientes están rodeados dentro del perineuro por una delicada cubierta de tejido conectivo laxo,

denominada endoneuro, como también por una pequeña cantidad de vasos sanguíneos llamados vasa nervorum que penetran en las vainas epineurales y perineurales hasta dividirse en un plexo capilar indefinido dentro del endoneuro, Fig. 1.

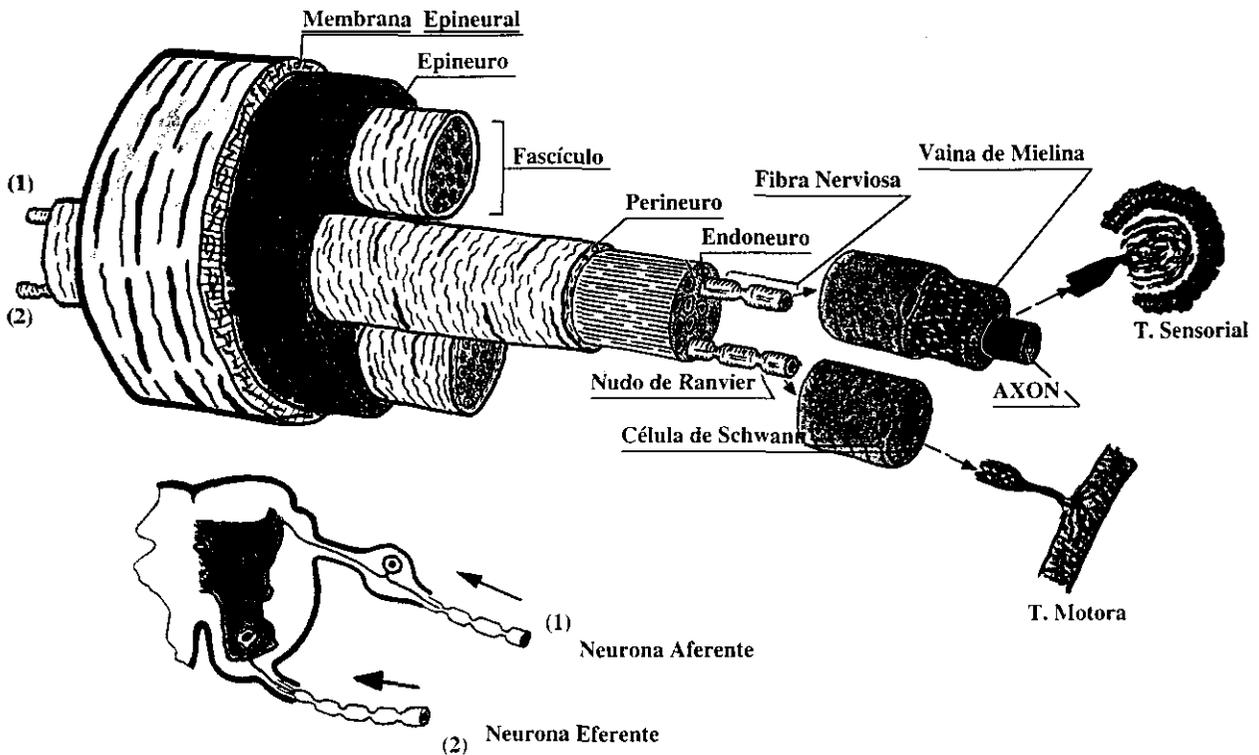


Fig. 1. Estructura microscópica del nervio periférico.

Shanthaverappa y Bourne²²⁰, estudiaron el perineuro de nervios de diversas especies y describen la existencia de una capa epitelial formada por células aplanadas que constituyen un revestimiento para la vaina perineural de tejido conectivo. Los nervios menores carecen de epineuro. Un nervio menor está formado por un tubo de perineuro dentro del cual hay tubos de endoneuro conteniendo cada uno una fibra nerviosa.

La vaina de mielina de un nervio periférico está rodeada por el protoplasma de una célula de Schwann; a su membrana celular se añade una membrana basal, la cual envuelve el internodo, aislando las fibras nerviosa unas de otras. La mielina de las fibras mielínicas no es continua; está interrumpida de manera periódica por estrechamientos llamados

nodos de Ranvier. En estos nódulos no hay mielina y la vaina de Schwann de la célula nerviosa se invagina y, no la cubre por completo en estos sitios, como se ha demostrado por los estudios de **Robertson**²⁰⁶ al Microscopio Electrónico (ME). La fibra nerviosa está descubierta en parte por lo tanto, habiendo una célula de vaina de Schwann entre dos nódulos.

En los nervios periféricos, la mielina entre los estrechamientos de Ranvier está interrumpida por fisuras o surcos pequeños que se extienden hacia ella desde la superficie. Estos sitios se denominan surcos de Schmidt-Lanterman, y los segmentos entre ellos se denominan segmentos de Schmidt-Lanterman. Los surcos han sido estudiados por métodos histoquímicos por **Shanklin y Azzam**²¹⁹.

Existe una relación entre el calibre del cilindroeje, el espesor de la vaina de mielina, la distancia entre los nodos de Ranvier y la velocidad de la conducción del impulso nervioso. Cuanto mayor es el calibre del axón, mayor es el espesor de la vaina de mielina y mayor la distancia internodal. Por ello cuando una fibra nerviosa está creciendo las distancias internodales aumentan progresivamente. La velocidad de la conducción aumenta a medida que aumenta la distancia internodal. Las fibras nerviosas se clasifican en A, B y C dependiendo de su contenido en mielina y la velocidad de la conducción. Las fibras de tipo A, fuertemente mielinizadas, tienen un diámetro que oscila entre 3-20 μm y una velocidad de conducción de hasta 20 m/s, las de tipo B están pobremente mielinizadas y su diámetro oscila entre 1-3 μm y los impulsos discurren a una velocidad de hasta 15 m/s. Finalmente las de tipo C son amielínicas y de conducción lenta (hasta 2 m/s).

Puede decirse que en las fibras amielínicas la propagación del impulso se produce de forma continua, mientras que en las mielínicas la transmisión de los impulsos se realiza a saltos. Las bases morfológicas de esta conducción saltatoria se hallan en la alternancia, a lo largo del nervio, de segmentos con cubierta mielínica (internodos) y de zonas desmielinizadas (nodos de Ranvier). Este tipo de conducción es mucho más rápido y requiere mucha menos energía que la propagación continua de la excitación nerviosa.

Los vasos que abastecen los nervios, son arterias y arteriolas de disposición longitudinal de tipo epineural, interfascicular, perineural e intrafascicular. El endoneuro contiene una redcilla capilar. Arterias nutricias penetran frecuentemente en el nervio a lo largo de su trayecto, procedentes de vasos extraneurales, y de vasos dispuestos longitudinalmente que acompañan al nervio, para comunicar con los vasos neurales. El número de anastómosis entre todos estos vasos es tan considerable que los nervios pueden quedarse en largo trecho desprovistos de los tejidos que les rodean. **Sunderland**²³⁹, insiste en la importancia de conservar los vasos superficiales que acompañan longitudinalmente a los nervios cuando estos se decortican, pues forman eslabones importantes del sistema que proporcionan tales anastómosis eficaces para la nutrición.

En lo referente a la histología del nervio periférico, a la observación de los cortes transversal de un nervio a nivel de la microscopía óptica se demuestra que la mielina que rodea a cada fibra nerviosa se ha disuelto durante el proceso de inclusión y deshidratación debido a su naturaleza lipídica. Esto hace que la fibra nerviosa se deslice hacia un lado del espacio tubular que crea la mielina a medida que se va disolviendo. Por lo tanto los cortes transversales teñidos con hematoxilina-eosina, o con cualquier tricrómico muestran la zona previamente ocupada por la vaina de mielina como pequeños espacios redondeados y vacíos.

En la zona externa del espacio se advierte un neurilema levemente teñido. Los núcleos observados son los del neurilema y de los fibroblastos y macrófagos del endoneuro, junto con los núcleos de los vasos sanguíneos. Sin embargo, en una preparación con ácido ósmico, la mielina que rodea las fibras nerviosas no se disuelve ni desaparece, sino que se conserva y se tiñe de negro. Se dice que es osmiófila. Por lo tanto, las vainas de mielina de las fibras nerviosas aparecen como anillos de color pardo-negruzco en este tipo de preparaciones. Pero los demás elementos del nervio no se observan muy bien. Estas preparaciones permiten poner de manifiesto que las fibras que componen un nervio tienen dimensiones diferentes.

3.c.- PROCESO DE DEGENERACION DEL NERVIO PERIFERICO

Waller²⁶² en 1850, fue el primero en descubrir las alteraciones que se producen tras la sección de un nervio. A él debe su nombre la denominada degeneración Walleriana que explica el conjunto de cambios que se producen en el segmento distal de un tronco nervioso después de haber sufrido una lesión que cause interrupción axonal.

En las primeras 12 horas que siguen a la sección axonal, no se observan signos de degeneración, excepto una cierta laxitud en la vaina de mielina que se acompaña de un aumento de actividad enzimática en el extremo distal del nervio.

A las 24 horas de la sección, se produce una abundante reacción tisular en el lugar de la lesión y se inicia una proliferación de tejido perineural procedente de ambos extremos, proximal y distal, hacia la zona de interrupción.

Al segundo y tercer día, la alteración de la vaina de mielina es más intensa y los cambios axonales se hacen visibles. La mielina comienza a segmentarse y se separa formando hileras de ovoides y elipsoides, entre los que se incluyen fragmentos axonales. Ya **Cajal**²⁵⁻²⁶, en 1928, observó que la segmentación de la vaina de mielina tiende a ocurrir en las segmentaciones de Schmidt-Lanterman. Esta fragmentación de la vaina de mielina, está asociada con hipertrofia e hiperplasia de las células de Schwann, **Bradley** y **Adsbury**²¹, 1970. Finalmente todas las fibras del extremo distal degeneran.

Hacia el cuarto día, una importante actividad mitótica se hace evidente en la población de células de Schwann, en la parte más distal del cabo proximal y por completo en el cabo distal. Las células de Schwann proliferante se alinean de forma longitudinal, dando lugar a las llamadas bandas de Bünger, en el interior de los tubos de Schwann. Ya **Thomas**²⁴⁷, en 1964, sugirió la posibilidad de que las células de Schwann sintetizaran un precursor de colágeno, que condicionara su agrupamiento alrededor de los tubos de Schwann.

Al octavo día de la sección, un corte longitudinal de la porción distal del nervio muestra una gran cantidad de glóbulos orientados longitudinalmente que corresponden a productos de degeneración de mielina que se cruzan con cabos ondulantes de proliferación de células de Schwann. Cuando el proceso regenerador procedente del cabo proximal falla, los tubos de Schwann encogen y el extremo distal del nervio se va contrayendo y siendo reemplazado por tejido conectivo quedando de él solamente un esqueleto.

Finalmente, en los días siguientes el axón y la mielina degenerados de los muñones distales de nervios periféricos cortados atraen macrófagos del endoneuro, que fagocitan el material degenerado. Se sabe que las células de Schwann colaboran activamente en la resorción de las fibras de mielina, al adquirir una actividad fagocítica ayudando a suprimir los restos en la zona lesionada, **Lassner**¹⁴⁶. Todos estos cambios secuenciales citados, se ilustran en la Fig. 2.

3.d.- PROCESO DE REGENERACION DEL NERVIO PERIFERICO

Desde las primeras horas siguientes a la sección nerviosa, existe una evidencia de actividad regenerativa con profusión de brotes axonales, formados preferentemente a expensas de las fibras amielínicas del muñón proximal. Estos brotes, se dirigen por contacto con las superficies y no por factores intrínsecos hacia los tubos de Schwann del fragmento distal. El descubrimiento del factor de crecimiento nervioso puso de manifiesto que el proceso de regeneración axonal se veía notablemente influenciado por los factores de crecimiento. **Seckel**²¹⁶, en 1986, demostró la gran importancia del extremo distal nervioso en la producción de factores de crecimiento necesarios para el proceso regenerador. El crecimiento masivo de células perineurales, fibroblastos y células de Schwann desde el extremo proximal y distal, da lugar a un puente por el cual los axones regenerantes pueden alcanzar el extremo distal, **Thomas**²⁵³, 1964. Posteriormente, estos axones regenerados continúan por los tubos de Schwann, progresando por el fragmento distal sin obstrucción.

En su progresión, estos axones son englobados por el citoplasma de las células de Schwann que han proliferado en gran cantidad. En el caso de

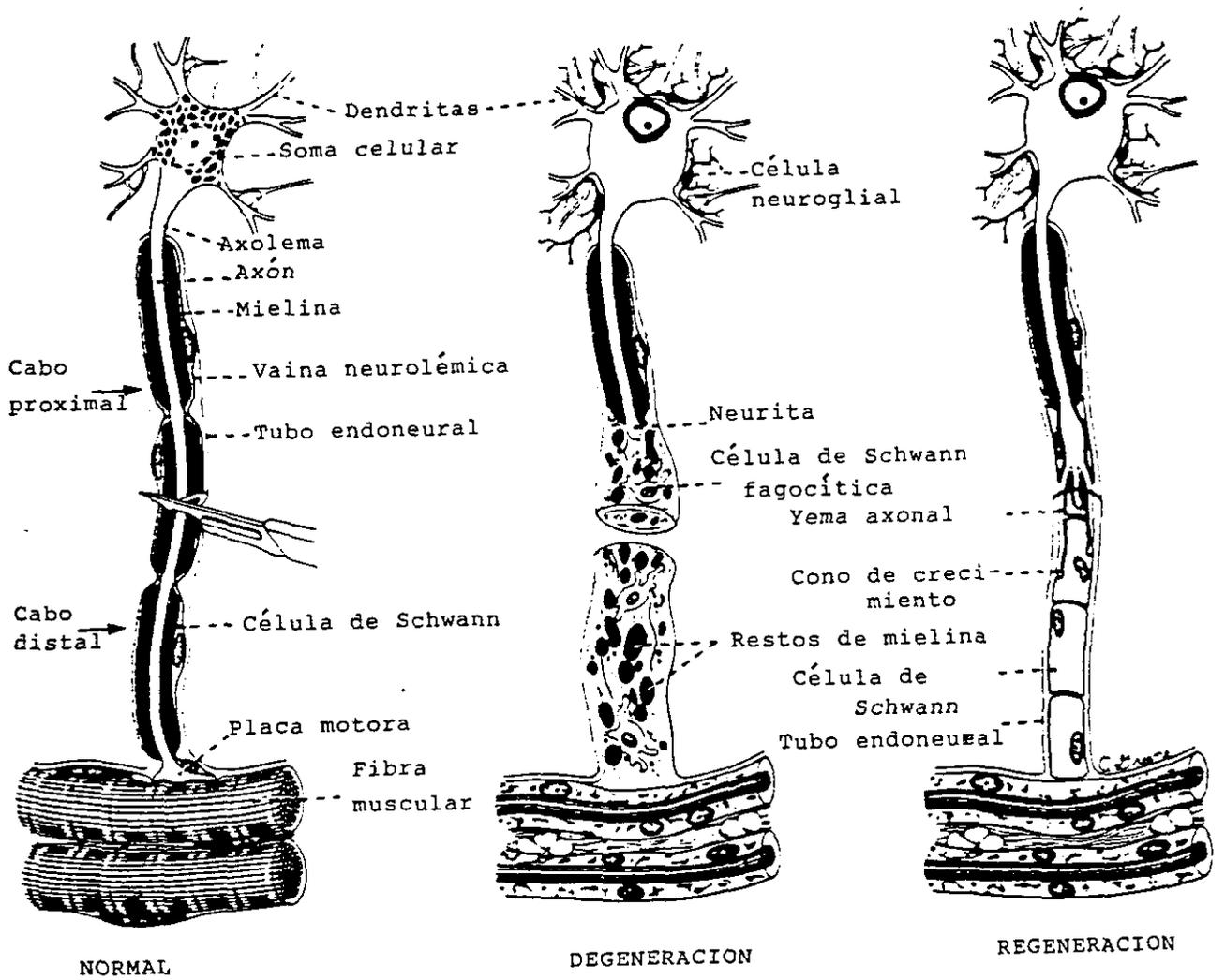


Fig. 2. Procesos de degeneración y regeneración del sistema nervioso periférico

las fibra mielínicas, estos axones sufren un proceso de selección que condiciona la permanencia del mayor de ellos, único que se beneficia del proceso de mielinización. Estas fibras mielínicas, aunque estructuralmente semejantes a las normales, son de tamaño más pequeño y no es extraño encontrar la presencia de dos fibras mielínicas en el interior de la vaina de Schwann.

Estos hechos hacen suponer que el afrontamiento de los cabos nervioso debe ser perfecto, para permitir el contacto entre los brotes axonales del polo proximal y la vaina de Schwann del polo distal. En caso contrario, los axones crecen a partir del extremo proximal, pero no pueden penetrar en los tubos Schwannianos del distal y dan lugar a una masa desorganizada o neurona traumática al final de aquél, mientras que las células de Schwann del extremo distal proliferan de forma anárquica originando un neuroma.

3.e.- REGENERACION DE LOS NERVIOS UNIDOS POR MEDIOS QUIRURGICOS

Si los dos extremos seccionados del nervio se unen y se sujetan en su sitio mediante puntos a través de sus envolturas de tejido conectivo, o bien se sostienen unidos por algún otro medio, se puede restablecer al menos en la zona afectada una parte de la función después de un periodo prolongado.

Lundborg¹⁵³ enfatiza en la importancia de dos factores necesarios para que se produzca la regeneración del nervio periférico: la lámina basal de un conducto axonal, y células de Schwann viables como elementos funcionales, que participarán activamente en la resorción de mielina durante la degeneración Walleriana y por otro lado facilitarán el inicio de la regeneración nerviosa al atraer axones en crecimiento desde el muñón proximal mediante la secreción de factores neurotrópicos.

En la parte del nervio distal a la sección, las fibras nerviosas de las neuronas aferentes y eferentes están seccionadas de sus cuerpos celulares, de modo que mueren y se necrosan. La desintegración de los axones requiere sólo un tiempo breve, y en unos cuantos días queda un poco de

desecho celular en el espacio que ocupaba antes el cilindroeje. Las vainas de mielina de esos axones que son seccionadas desde sus cuerpos celulares se descomponen también.

Las células de las vainas de Schwann proliferan y se cree que forman cordones que se encuentran en los tubos endoneurales. Esas células se multiplican dentro de los tubos de la lámina basal, para formar columnas longitudinales llamadas "bandas de Bünger". Los macrófagos del endoneuro fagocitan y digieren las gotas de mielina desdoblada y los residuos de los axones muertos.

Los fibroblastos, en particular los que están cerca del sitio en el que está cortado el nervio proliferan, pero a menos que el sitio del corte se haya infectado, no suelen proliferar con tanta rapidez como las células de la vaina de Schwann.

En tanto ocurren estos cambios del nervio distal al corte, ocurren cambios también en el muñón proximal. Cerca de la región de corte los axones degeneran al principio. Las células de la vaina de Schwann proliferan y crecen hacia el interior de nuevo y se unen con las del muñón distal. Así se establece la continuidad a través del corte gracias a las células de la vaina de Schwann y estas células tienen hendiduras entre ellas dispuestas de forma longitudinal. **Zalewski**²⁷⁹ insiste en la necesidad de mantener un adecuado enfrentamiento de los extremos suturados del nervio a fin de no privar al injerto de la influencia que sobre él ejercen los factores neurotróficos liberados desde los extremos. En este aspecto, **Bora y Grabb**¹⁹, defendieron la sutura perineural, Fig. 3, frente a **Wise**²⁷¹, que preferió la epiperineural, Fig. 4.

Una vez enfrentados los extremos, los cilindroejes de la porción proximal del nervio seccionado empiezan ahora a abrirse paso hacia delante, un poco cada día, y después de unos días llegan al espacio en el que había unión entre las dos salientes de las células de la vaina de Schwann.

Los axones, al crecer, se ramifican mucho y las diversas ramas se abren camino a través de dichas hendiduras y espacios según los encuentren; gran número de ellas se las arreglan para atravesar la región

del corte y desde ahí para crecer a lo largo de las vías minúsculas que existen en el sincitio proporcionado por las células de la vaina de Schwann hacia las aberturas de los tubos endoneurales del muñón distal. Bajo buenas condiciones, las fibras crecen por estos tubos a un ritmo que ha sido estimado de manera variable entre 1 y 4 mm por día. Conforme se aproximan a la terminación del nervio, crecen con un poco más de lentitud.

Debe observarse que con independencia de lo cuidadosamente que se unan entre sí los nervios seccionados, no puede esperarse que la mayoría de los axones que crecen encuentren el camino adecuado. Quizá ayude bastante que los axones, al llegar al sincitio de la vaina de Schwann que se forma en el sitio del corte, se ramifiquen en muchas ramas. De aquí que haya más axones en realidad creciendo a través del nervio seccionado que los que había antes entrando en ocasiones varios de ellos en un tubo endoneural.

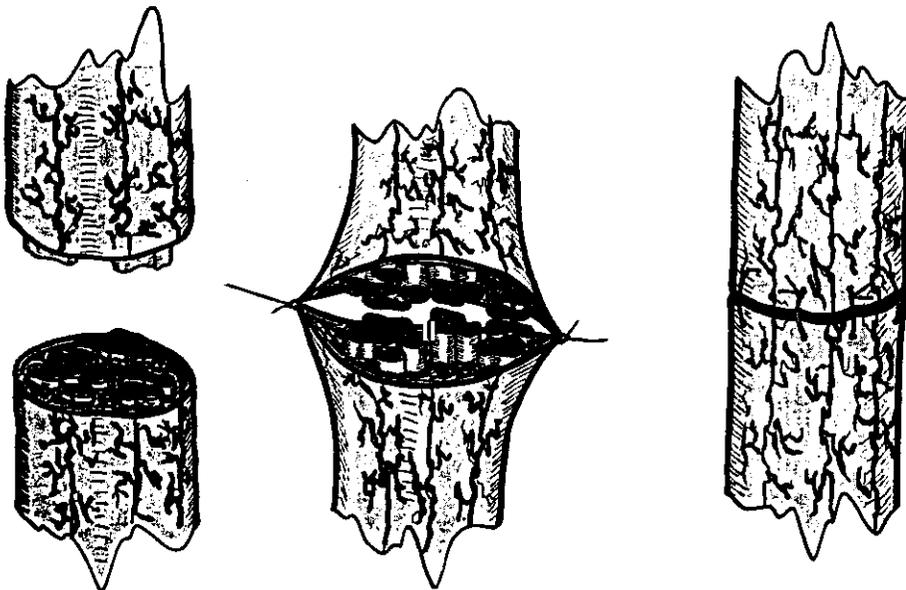


Fig. 3. Sutura epineural.

En un tubo endoneural, el axón nuevo se encuentra contra un cordón de células de Schwann. Estas últimas lo envuelven de manera gradual pero probablemente de manera muy semejante a como ocurre durante el desarrollo normal. Se forma a continuación mielina nueva,

probablemente del mismo modo que durante el desarrollo, y las células de Schwann con forma de cordón adoptan una vez más su aspecto maduro.

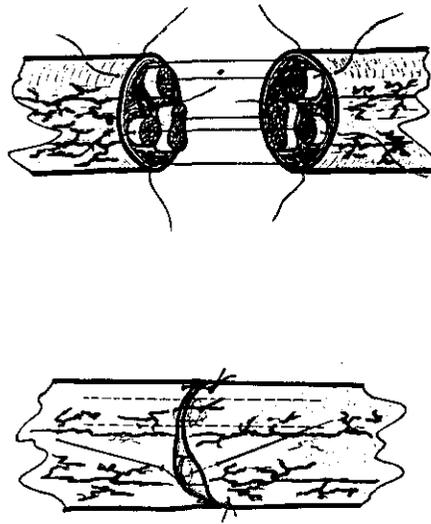


Fig. 4. Sutura epiperineural.

Por otra parte, un nervio voluminoso contiene varios haces de fibras. Cada haz está rodeado por una vaina densa de perineuro. Existe mucha comunicación entre los fascículos, y las fibras nerviosas pasan de unos a otros. En consecuencia, el volumen relativo de los fascículos de un nervio cambia continuamente en toda su longitud.

Para unir los dos muñones de un nervio, habiendo sido destruida una porción del mismo, hay que tirar de los dos extremos que se desea poner en contacto. Los nervios pueden someterse a tracción hasta cierto punto sin lesión, **Sunderland**²³⁷. Esto probablemente dependa en parte de que las fibras nerviosas no siguen un curso recto a lo largo del nervio, sino en "zig-zag". Al tirar de un nervio, sólo se enderezan las fibras sin someterlas a verdadera tracción.

El número de fibras incluidas en un fascículo varía mucho, al igual que el diámetro de las fibras nerviosas en el mismo. El aumento del número de fibras se atribuye a la ramificación de estas en el interior de los mismos nervios.

4.-HISTOLOGIA DEL ALOINJERTO DEL NERVIO PERIFERICO Y DEL RECHAZO POSTRASPLANTE

Sanders y Young²¹¹, en 1943, fueron los primeros investigadores que hicieron referencia al fracaso de aloinjertos como consecuencia de la respuesta inmune desencadenada contra el tejido transplantado. Treinta años después, **Pollard y Fitzpatrick**²⁰¹, basados en estudios ultraestructurales, asociaron el fracaso del aloinjerto con la invasión del tejido por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos activados. Sin embargo, no pudieron identificarse el tipo de linfocitos observados, ni la secuencia de invasión de los mismos ni pudieron ser cuantificados debido principalmente al bajo alcance de las técnicas disponibles en aquellos tiempos.

Estudios más recientes en transplantes de riñón y corazón, han mostrado que son dos las subpoblaciones de linfocitos T implicados en el rechazo alógeno. Los llamados linfocitos T helper o inductores (CD4), son los que juegan un papel predominante a la hora de reconocer antígenos del sistema HLA de clase II en el tejido transplantado, mientras que los linfocitos denominados T citotóxicos o supresores (CD8), son aquellos capaces de reconocer las moléculas del sistema HLA de clase I, expresadas en forma de antígenos en las superficies celulares del aloinjerto. La relación entre ambos linfocitos se produce en organismos que no han sido previamente sensibilizados contra el tejido donante, donde los linfocitos T helper desencadenan el inicio de la respuesta inmune celular estimulando la producción de linfocitos T citotóxicos, **Hall**⁹⁴.

Existen por otro lado otros elementos celulares que intervienen igualmente en el inicio de esta respuesta inmune secundaria a la realización del transplante. En otros tejidos, para desencadenar esta respuesta in vivo, se requiere que el antígeno de la célula donante sea presentado a las células T por células especializadas llamadas células presentadoras de antígenos (CPA) o células dendríticas, que se localizan habitualmente en el intersticio de la mayoría de los tejidos. En este sentido, el sistema nervioso ha sido considerado durante mucho tiempo un tejido inmunológicamente privilegiado, entre otras razones por no poseer estas células responsables en gran parte del inicio del rechazo tisular.

El fracaso del alotransplante de nervio periférico ha sido asociado tanto a la pobre vascularización de los axones en regeneración, **Comtet**³⁷, como a la severa interrupción en la arquitectura de la fibra nerviosa debida a la actividad de células mononucleares. La invasión del aloinjerto por linfocitos y macrófagos se describió como una respuesta inmune probablemente desencadenada bien por la mielina en degeneración o bien por la actuación del epineuro y tejidos circundantes como antígenos de trasplante.

A pesar de que en el desencadenamiento de la reacción de rechazo en el tejido nervioso no han sido encontradas CPA como se han descrito en otros tejidos, diversos estudios, **Lassner**¹⁴⁶, **Anselin**⁷, **Hall**⁹⁴, han reconocido un importante papel inmunológico a las células de Schwann que podrían comportarse como CPA induciendo a las células T del huésped a reconocer los antígenos del tejido donante. Una característica esencial de una CPA es su expresión de moléculas del CMH de clase I y II, de ahí la importancia de testar la presencia de estas moléculas en las células de Schwann para apoyar con ello la teoría del papel que desempeñan, como CPA, en el inicio del rechazo en trasplantes de tejido nervioso.

Estudios recientes confirman la observación de **Pollard** y **Fitzpatrick**²⁰¹, en 1973, acerca de la reacción de rechazo del aloinjerto, que se caracteriza por una importante respuesta inmunológica en la que predomina la invasión de linfocitos y macrófagos, y en la que se destaca el papel de la célula de Schwann como célula no pasiva que adquiere un papel decisivo a la hora de iniciarse la respuesta inmune.

En este ámbito, **Anselin**⁷ realiza un estudio inmunológico sobre trasplante alogénico de nervio periférico entre dos cepas de ratas histológicamente no compatibles, cuantificando el número de linfocitos T helper (T4) y T citotóxicos (T8) así como el número de macrófagos y la secuencia de aparición de los mismos durante los días 1 al 14 que siguieron a la realización del implante nervioso. Además, se estudia en el mismo periodo de tiempo, la expresión en el injerto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II. Los resultados obtenidos, muestran un aumento progresivo del número de

linfocitos T4 y T8 a partir del cuarto día de la realización del trasplante, número que alcanza su máximo hacia el día 6-7, hasta el punto que se hace muy difícil su conteo exacto en esos días. Este incremento en la población de linfocitos se hace principalmente a expensas de los linfocitos T citotóxicos que parecen proliferar más rápidamente como demuestra el descenso de la relación T4/T8 entre los días 4-7, siendo por tanto en el día 7 postrasplante claramente más bajo el número de linfocitos T helper respecto a los T citotóxicos. Aunque no es del todo conocido qué desencadena semejante incremento celular en tan corto periodo de tiempo, se sabe que, coincidiendo con otros estudios, **Ishida**¹³, el rechazo agudo postrasplante se produce exactamente entre los días 6 a 8 postoperación, que es cuando el injerto muestra signos de severa reacción inflamatoria, mostrándose la arquitectura del nervio alterada por semejante invasión celular, que por el contrario, no aparece en los casos control de trasplante autólogo. Dicho acúmulo celular predomina tanto en los alrededores de las líneas de sutura del injerto como en las proximidades de los vasos sanguíneos, lo que sugiere que la diseminación celular de linfocitos llega al tejido trasplantado desde el torrente sanguíneo.

A partir del día 10, el número de linfocito T4 y T8, a pesar de ser todavía muy alto, comienza a disminuir siendo más rápido el descenso de los T8. Ya en el día 14, el aloinjerto aparece como un conjunto de axones y células de Schwann en proceso de degeneración con acúmulos celulares de linfocitos interpuestos entre ellas. Hacia el día 21 el nervio trasplantado aparece como un tejido fibrótico invadido por fibroblastos y fragmentos de lámina basal de células de Schwann. No aparecen linfocitos y se detectan signos incipientes de regeneración axonal. Por el contrario, en los trasplantes autólogos, el incremento celular nunca alcanza el número observado en el aloinjerto y siempre existen niveles muy bajos de T4, alcanzándose al final del estudio un aceptable nivel de axones y células de Schwann en proceso de regeneración.

Otra célula que interviene en la reacción de rechazo tisular son los macrófagos que, en el aloinjerto nervioso en ratas, siguiendo el estudio de **Anselin**⁷, comienzan a proliferar lentamente a partir del día 3 postrasplante, incrementando de forma importante su número posteriormente desde el día 4 al día 10 en que alcanzan el punto de

máxima concentración. Este nivel se alcanza 3 días después de la proliferación máxima de linfocitos T4 y T8 que se produce en el día 7. A partir del día 10, y hasta el día 14, aunque se observa un lento declinar en el conteo de macrófagos, éstos siempre son las células predominantes respecto al número de linfocitos que también disminuyen en ese periodo. La localización de los macrófagos es alrededor de los axones y células de Schwann, a diferencia de los linfocitos que se sitúan preferentemente en las proximidades de los vasos. Hacia el día 21, se detectan muy pocos macrófagos, inmersos siempre en un tejido de predominio fibrótico sin células de Schwann ni axones nuevos. Por el contrario, en el injerto autogénico, a los 21 días del trasplante se observan signos evidentes de regeneración nerviosa habiéndose detectado hasta entonces un patrón paralelo al del aloinjerto en el incremento y posterior descenso del número de macrófagos aun cuando en el primer caso el número de macrófagos es siempre muy inferior al observado en el aloinjerto.

Como se ha referido anteriormente, existen estudios, **Ishida**¹¹³ que atribuyen a la célula de Schwann el papel de CPA. **Anselin**⁷, confirma esta teoría al detectar que estas células en el aloinjerto nervioso, expresan moléculas del CMH de clase I y II, lo cual es característico de estas células, y lo hacen ya desde el segundo día postrasplante. La expresión de estas moléculas afecta a células de Schwann tanto de fibras mielínicas como amielínicas y precede en dos días a la invasión celular de linfocitos T y de macrófagos. Aunque ambas moléculas son expresadas desde el día 2 del trasplante como se ha mencionado, es alrededor del día 6-7 cuando se observa un mayor número de moléculas del CMH de clase I en relación a las de clase II, lo que parece tener relación con el coincidente predominio de linfocitos T8 que son las células capaces de reconocer a estas moléculas de clase I. A partir del día 10 el número de moléculas de ambas clases ha descendido hasta hacerse muy similar, al igual que lo era el número de linfocitos T8 y T4, que son respectivamente los que identifican a las moléculas del CMH de clase I y II. Por el contrario, en el caso del autoinjerto nervioso, nunca se detectan moléculas de clase II, observándose únicamente moléculas de clase I en algunas células, presumiblemente macrófagos, desde el día 4 postrasplante. Es a partir del día 6 cuando empiezan a detectarse estas moléculas, y de forma muy leve, en la membrana de las células de Schwann que posteriormente irán

disminuyendo de forma progresiva desde el día 10 al 14 en que ya no se detecta ninguna molécula de clase I en estas células.

Yu²⁷⁷, con anterioridad, estudió la expresión de estos antígenos, tipo I y II del CMH en trasplante alo e isogénico de nervio periférico de rata, concluyendo que ambos eran expresados a bajos niveles en el nervio periférico normal (los de clase I en las células endoteliales y los de clase II en las células intersticiales-células de Schwann y fibroblastos-).

En contraposición, la expresión de estos antígenos en las células donantes de un injerto, dependía del tipo de trasplante realizado, de tal modo que sólo el aloinjerto y nunca el autólogo, era capaz de expresar los antígenos de tipo II, cuya máxima expresión podía ser detectada alrededor de los días 8 al 15 postrasplante, no detectándose posteriormente después de los 30 días. Este hallazgo sugería que la célula responsable de la expresión antigénica tipo II en el alotrasplante, después de haber sensibilizado con ello la inmunidad del receptor, era destruida por la reacción de rechazo desencadenada de este modo. La caracterización de estas células capaces de actuar como células presentadoras de antígenos, se produjo posteriormente, constatándose, como se ha señalado según Anselin⁷, que se trataba de células de Schwann.

Con estos datos, y aunque el tema que nos ocupa es la histología del alotrasplante de nervio periférico, parece oportuno establecer un paralelismo con los hallazgos histológicos en el autoinjerto nervioso para poder establecer comparativamente la diferencia entre los diversos hallazgos.

Así, analizando el aloinjerto nervioso, las primeras moléculas detectadas muy inicialmente son las moléculas del CMH de clase I y II expresadas por las membranas de las células de Schwann, que apenas 2 días después se acompañan de una progresiva invasión celular de linfocitos T4 y T8. Hacia el día 7 postrasplante se observa un importante acúmulo celular con predominio tanto de linfocitos T4 como de moléculas del CMH de clase I. Este momento, comprendido entre los días 7 al 10 postoperatorio, parece corresponder a la fase más destructiva de la respuesta inmune frente al aloinjerto. Por otro lado, el incremento progresivo de los macrófagos cuyo número se hace máximo hacia el día 10

y cuya persistencia se mantiene de forma importante durante los días 10 al 14, fase en que comienza a atenuarse la respuesta inmune de rechazo, sugiere que los dos tipos de linfocitos T intervienen en el reclutamiento y activación de los macrófagos, los cuales se hacen responsables de la destrucción directa de los componentes celulares del aloinjerto, junto a los linfocitos T4 a los que también se atribuye un papel citotóxico directo. La célula de Schwann por su parte, no sólo actúa como CPA frente a los linfocitos T, sino que finalmente se convierte en objetivo directo de la reacción de rechazo. Hacia el día 21 fibroblastos inmersos en restos celulares y fragmentos de lámina basal de células de Schwann en un tejido predominantemente fibroso en el que puede observarse algún brote axonal incipiente y donde la ausencia total de linfocitos, macrófagos y moléculas del CMH sugieren que el proceso de rechazo ha terminado.

El estudio histológico del autotrasplante de nervio periférico nos muestra al macrófago como célula predominante durante todo el proceso. Se observa un aumento progresivo de estas células hasta el día 10 en que paulatinamente comienza a disminuir su número, que en cualquier caso siempre es menor que en el aloinjerto. Por otro lado, los linfocitos invaden muy pobremente el injerto aun cuando siempre hay un predominio de los linfocitos T8 como ocurría en el alotrasplante, y las células de Schwann en cambio, sólo expresan moléculas de clase I, a diferencia del alotrasplante en que también expresaban moléculas de clase II, lo que apoya la no función de estas células en este caso, como CPA. Es más, en este tipo de injerto, nunca se desarrolla una reacción de rechazo sino simplemente una degeneración y posterior regeneración walleriana, de ahí que la célula predominante sea el macrófago, principal responsable del aclaramiento de restos tras la degeneración del tejido. El que el número de estas células sea siempre menor que el existente en el alotrasplante, puede deberse a que en el autoinjerto, la célula de Schwann funciona como fagocitadora de mielina, como se confirma en estudios de otros autores, **Grochowicz**⁸⁸, **Lassner**¹⁴⁶, colaborando de este modo con el macrófago en la función de eliminar residuos de tejido degenerado. La función de los linfocitos en el autotrasplante parece estar relacionada con el reclutamiento y activación de macrófagos y el reconocimiento de las moléculas del CMH de clase II expresadas por las células de Schwann, y no con una actividad predominantemente citotóxica como acontece en el alotrasplante. Hacia el día 21, sólo se observan células de Schwann y

acúmulos de brotes axonales en crecimiento, no detectándose signos de fibrosis, lo que confirma la no existencia de rechazo inmunológico en el autotrasplante.

Ishida¹¹³, estudia la respuesta inmunológica celular y humoral en el trasplante alogénico, hallando que aún cuando la reacción predominante y responsable del inicio del rechazo es característicamente celular, ésta, a través de los linfocitos T helper estimula la producción de linfocitos B, de tal modo que se describe, coincidiendo con el hallazgo de otros autores, **Mackinnon**¹⁵⁹, una respuesta inmunológica celular en la fase temprana del rechazo y una segunda fase más tardía en la que el sistema humoral estimula la producción de anticuerpos específicos, que se detectan en suero incluso en un tiempo superior a los 3 meses.

5.-RECHAZO DEL TRASPLANTE

5.a.-TERMINOLOGIA DEL TRASPLANTE.

Desde un punto de vista médico, y según refiere **Durán**⁵⁸, el trasplante puede definirse como el cambio o traslado de lugar de un órgano o tejido dentro de un mismo individuo, o su extracción y colocación en un individuo diferente.

El sujeto que cede el órgano o tejido se llama donante y el que lo recibe se denomina receptor o huésped. En términos clínicos, trasplante es sinónimo de injerto.

El éxito de un trasplante depende, entre otras cosas, de las relaciones genéticas entre el donante y el receptor. Estas relaciones permiten establecer una serie de definiciones, según refiere **Durán**⁵⁸, basándose en la clasificación de *Snell*:

- **Autoinjerto o trasplante autólogo.** El donante y el receptor son el mismo individuo; es decir, el injerto se obtiene y se coloca en el mismo sujeto.

- **Isoinjerto, trasplante isogénico, injerto isólogo o singénico.** El donante y el receptor, aunque son individuos diferentes, son de la misma especie y genéticamente idénticos: gemelos verdaderos u homocigóticos o animales de una misma línea consanguínea.

- **Aloinjerto, homoinjerto, injerto alólogo, trasplante alogénico o injerto homólogo.** El donante y el receptor son individuos de una misma especie, pero genéticamente diferentes.

- **Xenoinjerto, heteroinjerto o injerto heterólogo.** Donante y receptor pertenecen a especies diferentes.

Mientras que los dos primeros tipos de trasplante, autoinjerto e isoinjerto, son aceptados por el receptor los dos segundos, aloinjerto y xenoinjerto, no son aceptados por el receptor y su destino es el rechazo del trasplante. De ello puede deducirse la importancia de las relaciones genéticas entre donante y receptor.

Según la función que se espere del trasplante, éste puede catalogarse como trasplante vital o inerte.

- **Trasplante vital.** El órgano o tejido trasplantado continúa llevando a cabo todas las funciones fisiológicas propias después del trasplante. Sería el caso del trasplante de riñón o de corazón.

- **Trasplante inerte o estático.** El tejido u órgano trasplantado presta su organización estructural, pero no su dinámica, mientras los tejidos del receptor se regeneran y le sustituyen. Es el caso de los injertos óseos.

Teniendo en cuenta el lugar de implantación del injerto en el receptor se distinguen:

- **Trasplante ortotópico.** Ocupa el mismo lugar anatómico que el órgano del receptor al que sustituye.

- **Trasplante heterotópico.** El órgano o tejido trasplantado ocupa un lugar diferente al de su emplazamiento anatómico normal en el receptor.

Considerando la edad del donante y la del receptor, los trasplantes reciben la denominación de **isocrónicos**, cuando ambas edades coinciden, mientras que cuando el donante y el receptor tienen edades diferentes se habla de trasplantes **heterocrónicos**.

Según la técnica y los métodos empleados para la realización del trasplante, se distinguen las siguientes modalidades:

- **Injertos anastomosados.** Durante el acto operatorio se realiza anastomosis quirúrgica entre vasos del receptor y vasos del órgano trasplantado. Es el caso del trasplante renal o hepático.

- **Injertos pediculados o en colgajo.** Conservan conexiones vasculares con el área donante a través de un pedículo, generalmente de carácter temporal, hasta que el injerto se vasculariza a expensas de los vasos del área receptora, momento en el que se secciona el citado pedículo.

- **Injertos libres.** El injerto se separa completamente del área donadora en el momento de su obtención, colocándose a continuación o tras un período más o menos largo de tiempo en el área receptora. Su supervivencia queda asegurada por la invasión vascular del injerto por parte de los vasos del receptor, nutriéndose hasta que esto suceda por imbibición: son injertos de vascularización espontánea retardada.

- **Injertos transfundidos.** El injerto se realiza mediante la inyección de una suspensión celular en el torrente circulatorio, en una cavidad natural o en el seno de los tejidos o parénquimas viscerales del receptor.

Teniendo en cuenta el estado del donante el órgano o tejido a trasplantar puede obtenerse de un **donante vivo** emparentado o no con el receptor, o de un **cadáver**.

Según el número de órganos trasplantados, puede hablarse de **trasplantes único, doble o múltiple**. La implantación de más de un órgano en un solo acto operatorio se denomina **trasplante sincrónico o simultáneo**; si se hace en operaciones diferentes, separadas por un intervalo más o menos grande de tiempo se habla de **trasplantes sucesivos**.

5.b.- FISIOPATOLOGIA DEL RECHAZO.

Rechazo, es el conjunto de hechos que acontecen en el receptor una vez realizado el trasplante de un órgano o tejido.

Durante los primeros días que siguen al trasplante parece que el órgano es aceptado por el receptor, pero a partir de un momento determinado aparecen signos de sufrimiento del injerto y de menoscabo de sus funciones. El resultado final es la destrucción del trasplante, cuya estructura es sustituida por un tejido inflamatorio y fibroso, con infiltración perivascular de células mononucleadas de tipo linfocitario.

Así como la evolución espontánea de un auto o isoinjerto es relativamente simple, la evolución natural de un aloinjerto o xenoinjerto conduce indefectiblemente al rechazo del mismo por parte del receptor.

Los diferentes componentes de la reacción de rechazo, siguiendo el símil de un arco reflejo, son los siguientes:

1. Antígenos de trasplante o de histocompatibilidad del donante, que constituyen el estímulo que pone en marcha la reacción inmunológica del rechazo.

2. Arco aferente o modo de acceso de los antígenos de trasplante al sistema linfático del receptor, para que tenga lugar el reconocimiento de tales antígenos como algo no propio o extraño al organismo.

3. Centros linfáticos o lugar donde se elabora una respuesta al estímulo.

4. Arco eferente o brazo de salida de la respuesta, que es doble, comprendiendo una respuesta humoral, en forma de anticuerpos circulantes, y otra respuesta celular mediada por linfocitos sensibilizados frente al antígeno específico. El arco eferente, con su doble brazo, constituye el mecanismo efector de la reacción de rechazo.

5.c.- INMUNOLOGIA DEL RECHAZO.

5.c.1.- Antígenos de trasplante o de histocompatibilidad

Antígeno de trasplante es todo aquel capaz de provocar en el receptor, una reacción de rechazo del aloinjerto. Estos antígenos pertenecen al donante y son fabricados por las células siguiendo el esquema general de la síntesis proteica, situándose en la membrana celular del injerto. Constituyen la marca de individualidad del órgano o tejido a trasplantar, debido a la enorme trascendencia que juegan en los fenómenos de reconocimiento e interacciones celulares del rechazo.

Dichos antígenos, se encuentran bajo control genético, y son reconocidos como extraños por el receptor, a menos que donante y receptor sean genéticamente idénticos. De ellos, unos son más potentes que otros, por lo que se distinguen antígenos menores y mayores o débiles y fuertes respectivamente, en los mamíferos. En el hombre los antígenos más potentes son los llamados HLA, codificados por un conjunto de genes llamado complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Existen también otros genes, distintos del CMH, que controlan los antígenos débiles de trasplante y que pueden igualmente participar en la reacción inmunitaria del rechazo.

Además del sistema ABO eritrocitario, que posee antígenos fuertes de trasplante, en el hombre existe un grupo de antígenos mayores, que constituyen el sistema HLA (Human Leucocyte Antigens), situado en la región 21 del brazo corto del cromosoma 6, **Farreras**⁶⁷. Este sistema de antígenos está codificado por el conjunto de genes del CMH, y se encuentra presente en la superficie de todas las células nucleadas, con una concentración especialmente elevada en los leucocitos, las plaquetas y las células cutáneas.

En la región mencionada del cromosoma 6, existen cuatro loci, denominados A, B, C y D. Los tres primeros, se encargan de la codificación de los antígenos HLA de clase I. El locus HLA-D, que incluye los subloci DP, DQ y DR, rige la síntesis de los antígenos HLA de clase II. El CMH

controla además, mediante genes situados entre los loci HLA-B y HLA-D, algunos componentes del sistema de complemento (factor B de la vía alternativa de activación, C2, C4), a los que algunos autores denominan antígenos de clase III, Fig. 5.

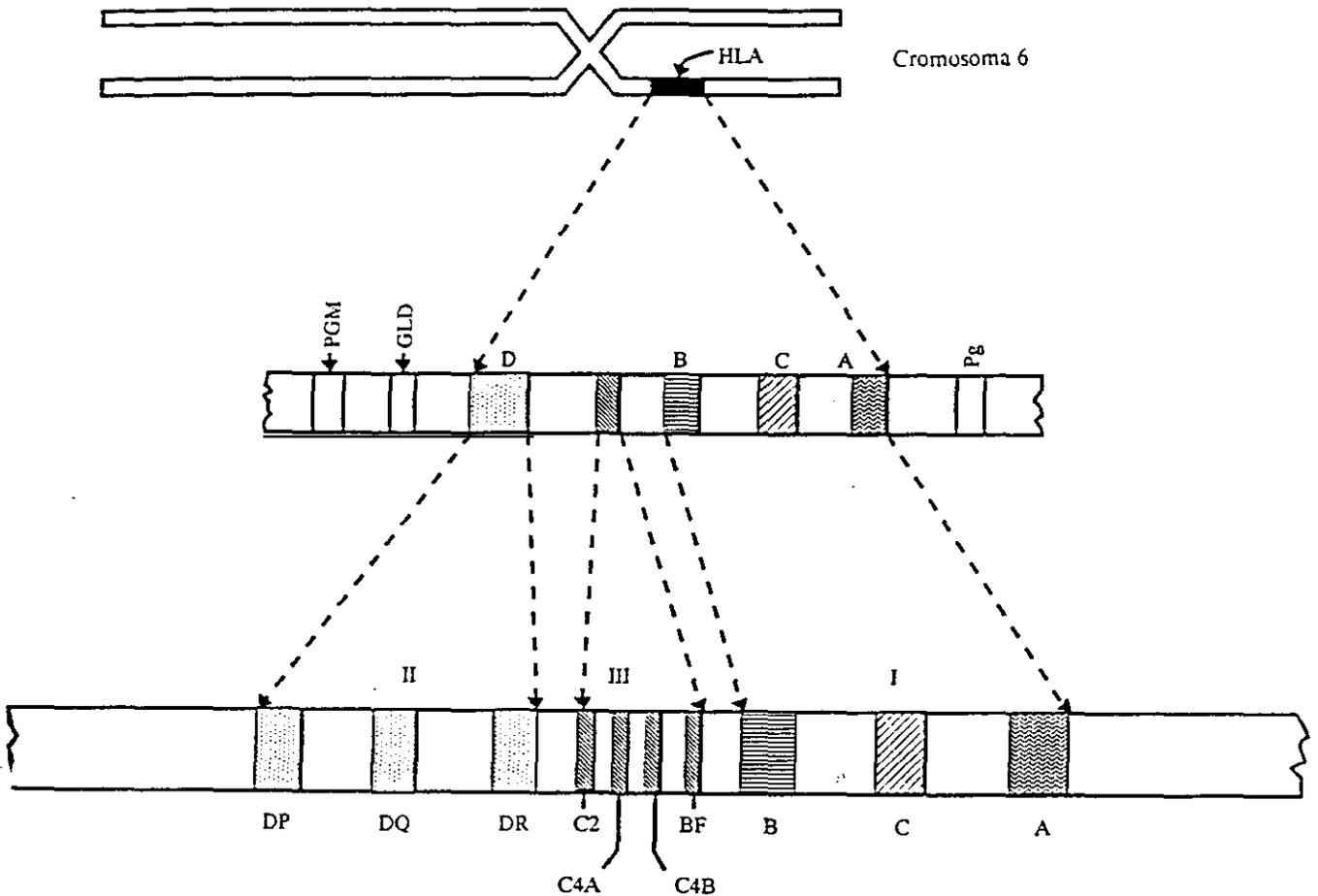


Fig. 5. Sistema HLA del CMH.

Los antígenos de clase I se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas somáticas, a diferencia de los antígenos de clase II, que sólo los poseen un número restringido de células: la mayoría de los linfocitos B, las células T activadas, las llamadas células presentadoras de antígeno (monocitos-macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas) y las células epiteliales del timo.

Tanto los antígenos de clase I como los de clase II, muestran analogías estructurales con las inmunoglobulinas.

La presencia de antígenos HLA en la superficie celular se detecta por un procedimiento serológico (utilizando antisueros antígeno-específicos conocidos que aglutinan o destruyen las células portadoras del antígeno) o por cultivo mixto de linfocitos. Este doble procedimiento ha permitido distinguir dos grupos de antígenos en el sistema HLA: antígenos HLA-serológicamente definidos (HLA-SD) y antígenos HLA definidos mediante cultivo mixto de linfocitos (HLA-LD).

El primer método, el serológico, ha sido el utilizado habitualmente para la identificación de antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C, es decir, los de clase I, aunque actualmente también puede ser de aplicación para los antígenos de clase II (antígenos HLA-DR), si bien todavía no se dispone de antisueros para todos ellos. El cultivo mixto de linfocitos permite la identificación de los antígenos de la región HLA-D.

5.c.2.- Reconocimiento antigénico del donante por el receptor.

Los antígenos de histocompatibilidad del donante acceden hasta el sistema inmunocompetente del receptor, para que tenga lugar el reconocimiento de tales antígenos como algo no propio al organismo y, de esta forma, es inducida la inmunidad de trasplante.

Los linfocitos llamados T cooperadores o T helper (Th), reconocen los antígenos de clase II alogénicos y los linfocitos T citotóxicos (Tc), hacen lo propio con los antígenos de clase I.

El acceso de los antígenos puede hacerse de tres formas:

- Células del propio trasplante que son portadoras de antígenos de clase II, como linfocitos, macrófagos y células dendríticas, que pasan a la circulación venosa o linfática del receptor.

- Fracciones celulares particuladas o solubles procedentes del trasplante que, por vía sanguínea o linfática, llegan a los centros linfoides.

- Algunos linfocitos circulantes del receptor pueden ponerse directamente en contacto con los antígenos en el momento en que,

después de abandonar la circulación sanguínea, atraviesan el injerto. Estos linfocitos sensibilizados periféricamente, que generalmente son un pequeño número, retornan al ganglio linfático regional por vía linfática.

5.3.c.- Centros linfoides

Los órganos linfoides secundarios, bazo y ganglios linfáticos principalmente, son los encargados de transformar el estímulo antigénico en respuesta efectora.

El sistema inmunitario deriva de una célula precursora, que puebla los órganos linfoides centrales o primarios: el timo, encargado de la inmunidad de mediación celular, y la médula ósea, que dirige la inmunidad de mediación humoral.

Los órganos linfoides primarios controlan, a su vez, a los órganos linfoides secundarios o periféricos, representados por el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide de las mucosas. Dentro de éstos, se distinguen zonas timo-dependientes y zonas timo-independientes.

Las áreas timo-dependientes de los ganglios linfáticos y del bazo, contienen los llamados linfocitos T, responsables de la inmunidad celular, mientras que las áreas timo-independientes, contienen los llamados linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral a través de la producción de anticuerpos.

Cuando una célula T o B virgen, es decir, que no ha tenido contacto previo con un antígeno, se estimula antigénicamente se transforma en una gran célula basófila, que a su vez se diferencia originando dos tipos de células:

- Células efectoras de la respuesta inmunitaria, tanto de la respuesta celular (mediante el linfocito T efector o citotóxico, en el caso de las células T) como de la respuesta humoral (mediante las células plasmáticas secretoras de anticuerpos, en el caso de las células B).

- Células memoria, que no intervienen en la primera respuesta, pero ante una nueva estimulación por el mismo antígeno, proliferan y se diferencian en células efectoras, de inmunidad celular o humoral, con mayor rapidez y eficacia que las células vírgenes. Cuando el antígeno llega por vía venosa, la respuesta es más precoz, pero menos intensa y persistente, existiendo una mayor respuesta cuando el antígeno alcanza los centros linfoides por vía linfática.

El macrófago o sus equivalentes (células presentadoras del antígeno o CPA) no sólo capta el antígeno alogénico, sino que además lo procesa en su interior y lo expresa en su membrana, junto con su propio antígeno HLA de clase II, para así presentárselo al linfocito.

Dentro de los linfocitos T, existen tres subpoblaciones o subgrupos:

- Células T cooperadoras, colaboradoras, inductoras o helper (Th), denominadas así por la ayuda que prestan tanto a las células B, en su diferenciación hacia células plasmáticas, como a las células T en su diferenciación hacia células efectoras o citotóxicas.

- Células T citotóxicas (Tc), que tienen un efecto citolítico por contacto directo con las células diana que poseen el antígeno frente al que han sido activadas. Las células Tc, junto con las células de la hipersensibilidad retardada, reciben la denominación de células T efectoras.

- Células T supresoras (Ts) ejercen funciones opuestas a las de las células T cooperadoras. El conjunto de las células T supresoras y T cooperadoras recibe el nombre de células T reguladoras.

Tanto los linfocitos T como los linfocitos B poseen en su membrana distintos marcadores, designados internacionalmente como CD (Cluster of Differentiation) o grupo de diferenciación que permiten determinar los distintos tipos y subpoblaciones linfocitarias.

Células nulas son aquellos linfocitos, en número pequeño, denominados así porque no poseen inmunoglobulinas de superficie (característica de las células B) ni receptor clonotípico (característico de los

linfocitos T). Algunos autores creen que estas células pueden ser células T supresoras.

Entre la población de células nulas, por su actividad, se han descrito dos subpoblaciones:

- Linfocitos K (de killer), que muestran capacidad para destruir células diana cubiertas de anticuerpos en su superficie (citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente).

- Linfocitos NK (de natural killer), dotados de actividad citolítica por contacto directo con células en estadios precoces de diferenciación (tumores o infectadas por virus).

5.c.4.- Elaboración de la respuesta inmunológica

Para que la respuesta inmunitaria se amplifique y el rechazo se produzca, es imprescindible la cooperación celular. En este sentido, los acontecimientos suceden de la siguiente forma:

El macrófago o sus equivalentes, células presentadoras de antígeno o CPA, captan el antígeno procesándolo en su interior y expresándolo en su membrana junto con sus propios antígenos HLA de clase II, para presentárselo de esta forma al linfocito Th poseedor de los mismos antígenos HLA de clase II que la CPA.

Las células B, pueden captar el antígeno-alogénico uniéndose a él directamente mediante su inmunoglobulina de superficie, o hacerlo también mediante su Ig, acoplándose al antígeno expresado en la superficie de la CPA. De esta forma es reconocido por el linfocito Th, portador como en el caso anterior, de idénticas moléculas de clase II a las del linfocito B portador del antígeno.

El macrófago, que constituye la llamada unidad de presentación al unirse al antígeno, cuando se acopla al linfocito Th, comienza a liberar un factor humoral (monocina), llamado interleucina-1 (IL-1).

El linfocito Th, estimulado por la IL-1, comienza a secretar la linfoquina IL-2, que estimula la proliferación y expansión clonal tanto de los propios linfocitos Th, como de los linfocitos B y de los linfocitos Tc, seleccionados y activados por el contacto antigénico.

El linfocito Th activado libera además otras linfoquinas, tales como el factor de crecimiento de las células B (BCGF), que estimula su proliferación, y el factor de diferenciación de las células B (BCDF), que estimula la secreción de anticuerpos por las células B plasmáticas. Dicho linfocito secreta también el factor de diferenciación de las células NK (NKDF) y el interferón gamma (gamma-IFN), que estimulan la proliferación y activación de las células NK.

Parece ser que las células Ts son los únicos linfocitos T capaces siempre de reconocer el antígeno alogénico sin que esté asociado a los antígenos HLA.

En el caso concreto de la reacción de rechazo, un hecho de suma importancia es que los antígenos HLA alogénicos, por tener una gran capacidad inmunogénica, pueden ser reconocidos directamente por las células inmunocompetentes del receptor sin que sea necesaria su conjunción, en forma de unidades de presentación, con los antígenos HLA propios, como es habitual en las reacciones inmunológicas desencadenadas por otros antígenos. Este hecho, denominado reconocimiento alogénico, puede demostrarse fácilmente mediante el cultivo mixto de linfocitos. Por ello, los linfocitos Tc reconocen directamente los antígenos extraños de clase I y los linfocitos Th hacen lo propio con las moléculas de clase II alogénicas.

Las células Ts pueden ejercer un efecto regulador negativo tanto sobre el desarrollo de linfocitos B como de linfocitos Tc.

El antígeno de clase II alogénico hace que los linfocitos Th proliferen e interaccionen con células T y B, dando lugar a linfocitos Tc y células B productoras de anticuerpos, que desarrollan su actividad contra antígenos alogénicos de clase I. Los linfocitos, pues, proliferan en respuesta a antígenos de clase II y se diferencian contra antígenos de clase I. De ello

puede deducirse que en el trasplante de órganos, con vistas a minimizar el rechazo, la similitud de antígenos HLA-D/DR (moléculas de clase II) entre donante y receptor puede ser tan importante o más que la similitud de los antígenos de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C).

En resumen, como consecuencia de la respuesta de los centros linfoides a la estimulación antigénica, sucede que un pequeño número de linfocitos que resultó estimulado por un antígeno alogénico, da lugar a la diferenciación de un gran número de células efectoras, es decir, se produce una expansión de la respuesta inmunológica.

5.c.5.- Mecanismo efector de la respuesta inmunológica.

El mecanismo efector de la reacción de rechazo es el proceso que el organismo pone en marcha para deshacerse del órgano trasplantado mediante la respuesta inmunológica, la cual es elaborada en los centros linfoides y ejecutada en la periferia. Este mecanismo es extraordinariamente complejo y en él participan múltiples factores, de los que no todos están aclarados.

La elaboración de la respuesta inmunológica en los centros linfoides tiene lugar en dos fases:

La fase antígeno-específica que es la fase más incipiente de la reacción inmunológica y conlleva el reconocimiento del antígeno y la activación celular. En ella se lleva a cabo la selección clonal de las células implicadas en el rechazo: es la fase inductora de la respuesta inmunológica.

La fase no antígeno-específica que es la fase efectora de la respuesta inmunológica, en la que se produce una expansión clonal y una amplificación de la misma. En ella juegan un importante papel los mediadores humorales secretados por los monocitos (monocinas) y por los linfocitos (linfocinas). Igualmente, la activación de una serie de sistemas enzimáticos (complemento, coagulación, cininas) y el reclutamiento y acción de otros tipos celulares que contribuyen de forma inespecífica, pero decisiva, a la destrucción del injerto.

El mecanismo efector de la reacción de rechazo consta de dos componentes, celular y humoral:

El **mecanismo celular** está representado por los linfocitos T sensibilizados y sus productos de secreción (linfocinas) o mediadores humorales de la inmunidad celular. De ellas, las más conocidas son la IL-1, la IL-2, la IL-3 y el IFN-gamma, que actúan ampliando la respuesta específica de la inmunidad celular y estimulando mecanismos defensivos inespecíficos, con reclutamiento y activación de polinucleares, eosinófilos, monocitos, macrófagos y células Killer (K) y Natural Killer (NK), que participan activamente en la destrucción del órgano trasplantado sin necesidad de sensibilización antigénica previa.

El **mecanismo humoral** está representado por los anticuerpos específicos circulantes que mediante la unión con el antígeno activan diversos sistemas que conducen a la muerte celular, (reacción antígeno-anticuerpo). De estos sistemas los más importantes son:

El **sistema de complemento**, capaz de producir la lisis celular tras una reacción secuencial o activación en cascada de los distintos componentes del sistema.

El **sistema de la coagulación**, que tras ser activado por los productos de la lisis celular, o directamente por los complejos inmunes, produce oclusión vascular del órgano trasplantado, a los que se suman los acúmulos celulares intra y perivasculares que crean una situación de estasis que favorece igualmente la trombosis.

El **sistema de cininas**, que aumenta la permeabilidad vascular, dilata las arteriolas periféricas y ejerce una acción quimiotáctica sobre los polinucleares.

Este mecanismo inmunológico efector del rechazo queda ilustrado en la Fig. 6.

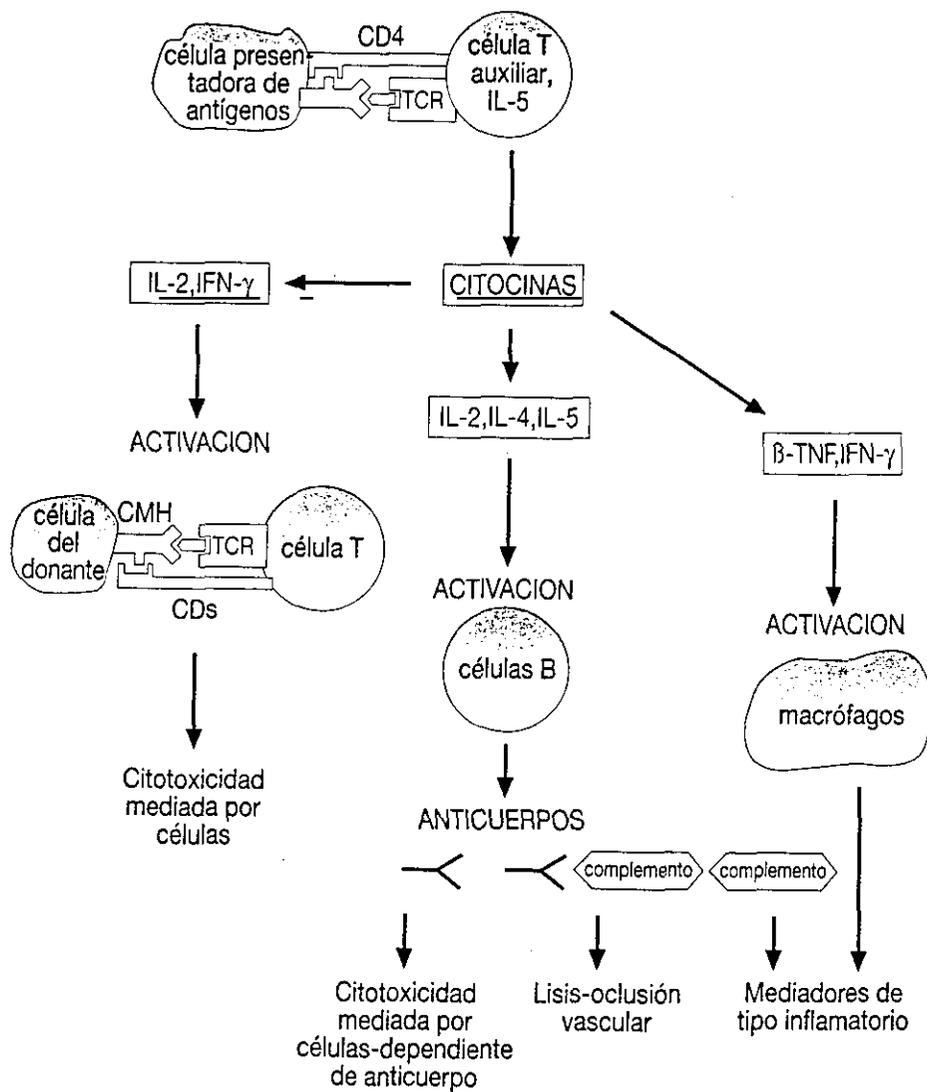


Fig. 6. Inmunología del rechazo.

5.d.-TIPOS DE RECHAZO

En el hombre se han descrito tres tipos de rechazo:

1.- Rechazo hiperagudo: Comienza inmediatamente después de realizado el trasplante y aparece en individuos con anticuerpos preformados en el momento de efectuar el trasplante, como puede ser en el caso de incompatibilidad ABO entre donante y receptor, por haber recibido un aloinjerto previo o en el caso de las mujeres, por haber tenido múltiples embarazos.

Se debe a una reacción antígeno-anticuerpo y a la activación consecuente del complemento que mediante la formación de un trombo ocluirá la luz vascular y producirá la necrosis del trasplante.

2.- Rechazo agudo: Se establece después de días o semanas de realizado el trasplante. El papel principal en esta modalidad de rechazo corresponde a los linfocitos citotóxicos aunque también participan los anticuerpos circulantes. Es la modalidad más frecuente de rechazo.

3.- Rechazo crónico: Se produce mucho tiempo después (meses o años) de haber realizado el trasplante, cuando se abandona o disminuye el tratamiento inmunodepresor. Es un rechazo de mediación humoral predominantemente.

5.e.- PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL RECHAZO.

Existen distintos procedimientos utilizados para evitar el rechazo:

1. Disminución de la antigenicidad del órgano trasplantado: mediante la utilización de métodos como la congelación, liofilización, radiación, hipoxia, perfusión con diversas soluciones, etc.

2. Selección adecuada de donante y receptor: tratando de buscar la máxima semejanza entre los antígenos de histocompatibilidad de donante y receptor.

3.- Depresión inmunológica inespecífica: mediante la utilización de métodos físicos (irradiación general o local y extacorpórea de la sangre), métodos químicos o drogas inmunosupresoras (corticosteroides; antimetabolitos como azatioprina; agentes alquilantes como ciclofosfamida y antibióticos como ciclosporina y FK-506) y métodos biológicos (esplenectomía, linfadenectomía regional, drenaje del conducto torácico, transfusiones sanguíneas previas, suero antilinfocítico y anticuerpos monoclonales).

4.- Tolerancia inmunológica: mediante la creación de un estado de no reactividad frente a un antígeno específico que en condiciones normales determinaría una respuesta celular o humoral frente al mismo.

5.- Amplificación inmunológica: mediante la administración de anticuerpos específicos contra el antígeno de trasplante, que prolongue la supervivencia del mismo.

6.- FK-506

6.a.- AISLAMIENTO Y SINTESIS

La amplia utilización de la CyA como droga inmunosupresora de primera línea en la realización de trasplantes, y principalmente el haber sido aislada de un hongo, llevó a **Kino, Hatanaka y Hashimoto**¹³² a la búsqueda de nuevas drogas con propiedades inmunosupresoras, para lo que utilizaron una gran diversidad de cultivos fermentados. Como resultado de ello, en 1984 estos investigadores hallaron, a partir de la cepa N° 9993 de un cultivo de *Streptomyces tsukubaensis*, cuyo nombre se debe al suelo de donde fue aislado en Japón, una sustancia con potentes propiedades inmunosupresoras que fue designada, utilizando la numeración y nomenclatura del laboratorio, como FK-506 y comercializada posteriormente con el nombre de Tacrolimus.

Para la obtención de esta nueva droga, son utilizados 1.500 l de caldo de cultivo donde es inoculada la cepa de *Streptomyces tsubakensis* que será cultivada a 30°C durante 4 días. Este organismo alcanza su

máximo crecimiento a las 40 horas de su incubación, momento en que comienza la síntesis de FK-506 observándose el máximo de su producción a las 90 horas del inicio de la incubación. La droga inmunosupresora es aislada mediante un proceso químico, manteniéndose después a bajas temperaturas para permitir su cristalización y obtener finalmente a partir de los 1500 l de caldo de cultivo, 13,6 gr de FK-506 purificado y cristalizado en forma de prisma sin color, **Goto, Kino, Hatanaka**⁸².

6.b.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y BIOLOGICAS

FK-506 se presenta cristalizado en forma de un prisma, siendo su fórmula molecular $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ y su peso molecular de 822.05. Su estructura química pertenece al grupo antibiótico de los macrólidos.

FK-506 es soluble en metanol, etanol, acetona, etil acetato, cloroformo y dietil-éter; moderadamente soluble en hexano y petróleo éter e insoluble en agua, según refieren los autores **Tanaka**²⁴³. Así mismo, FK-506 se mantiene estable en condiciones medioambientales normales, así como en un medio ácido muy diluido y admite ser almacenado bajo condiciones extremas tales como altas temperaturas, humedad ambiental elevada y bajo exposición luminosa de lámparas fluorescentes.

Biológicamente FK-506 posee actividad antimicrobiana y antifúngica. Igualmente es considerado como un potente inmunosupresor, tanto *in vitro*, por su capacidad de inhibición sobre el cultivo mixto de linfocitos de ratón, como *in vivo* por su efecto supresor sobre la actividad inmunitaria humoral y celular y sobre la reacción local injerto contra huésped también en el ratón, mostrando en todos los casos una actividad superior a la ejercida por la CyA, **Kino, Hatanaka**¹³³.

6.c.- PROPIEDADES FARMACOCINETICAS

La cuantificación de FK-506 y sus metabolitos en los fluidos biológicos es realizada mediante el método ELISA y estudios de cromatografía. De esta forma se sabe que esta sustancia es pobre y erráticamente absorbida tras una dosis oral de 0.15 mg/Kg, alcanzando un

pico de concentración máxima en plasma de 0.4 a 5.6 µg/l, que se produce a las 0.5 a 8 horas de administrar la dosis referida. Se demuestra además, que el alimento disminuye la absorción oral de esta droga. Por otro lado, la perfusión intravenosa de esta sustancia, a la dosis de 0,15 mg/kg/día, alcanza una concentración máxima a las 2 horas de 10 a 24 µg/l, según estudios de **Venkataramanan et al**²⁶¹. En plasma, FK-506 permanece unido a proteínas en un 88%.

La elevada lipofilia de FK-506 hace que sea muy extensa su distribución tisular, hallándose en órganos tales como pulmón, bazo, corazón, riñón y páncreas, concentraciones mayores que en plasma. En el compartimento vascular humano también se observa diferencia en la concentración de esta sustancia, siendo de 10 a 30 veces mayor en sangre total que en plasma. Esto se debe a la capacidad de los eritrocitos de fijar el 75 a 80% de esta droga, propiedad en la que también interfiere la temperatura, siendo a mayor temperatura menor la fijación de FK-506 y por tanto mayor la concentración en plasma, **Japanese FK-506 study group**¹¹⁸.

Esta droga es metabolizada ampliamente en el hígado, excretándose invariable sólo un 1% en bilis, orina y heces durante las 48 horas siguientes a su administración oral o intravenosa. Como resultado de este proceso, son identificados 9 metabolitos de FK-506 de los cuales sólo dos poseen actividad inmunosupresora *in vitro*, **Christians**³⁴.

La metabolización hepática se debe principalmente al citocromo P450, subtipos I y IIIa, y se lleva a cabo mediante reacciones de desmetilación e hidroxilación, **Sattler**²⁰⁹. Por tanto, una disfunción hepática interfiere con el metabolismo de FK-506, detectándose en estos casos, un aumento de su concentración y vida media en plasma y una disminución de su aclaramiento. Por el contrario no es esperable modificaciones de la farmacocinética de esta droga en pacientes con afectación de la función renal, **Jain**¹¹⁷.

6.d.- MECANISMO DE ACCION

FK-506 posee actividad inmunosupresora similar, aunque más potente, a la CyA, inhibiendo las dos tanto la inmunidad celular como la humoral. Ambas drogas poseen una marcada afinidad por las proteínas citoplasmáticas de las células inmunosupresoras (inmunofilinas).

La inmunofilina predominante a la que se une FK-506 en el citoplasma del linfocito T se denomina FKBP12 (FK-506 binding protein 12). El complejo formado por la unión de ambas se ha propuesto como el desencadenante biológico responsable de la interacción con moléculas intracelulares implicadas en la señal de transducción, **Bierer**¹⁵, **De Franco**⁴⁵, **Schreiber**²¹⁴. Así, dicho complejo se une a su vez competitiva y específicamente al complejo calcio dependiente, calmodulina-calcioneurina al cual inhibe, **Fruman**⁷³, **Liu**¹⁴⁸, **Stewart**²³³, impidiendo de esta forma que progrese la señal de transducción que tiene por objeto la transcripción final de los genes del DNA celular que codifican la síntesis de IL-2, **Banerji**⁹, **Baumann**¹³, **Brabletz**²⁰.

El linfocito T activado posee un factor citosólico nuclear de transcripción (NF-AT), que es el responsable de que la célula T activada exprese la IL-2. Dicho factor posee una subunidad citoplasmática (NF-ATc) y una subunidad nuclear (NF-ATn) que se unen en el citosol nuclear para iniciar la transcripción de los genes que codifican la IL-2. Este proceso es calcio-dependiente y está mediado por la calcioneurina, la cual es bloqueada por FK-506, impidiéndose por tanto con ello la producción de IL-2 en células T humanas activadas antigénicamente, **Flanagan**⁷⁰, **McCaffrey**¹⁶⁴, Fig. 7.

Tanto CyA como FK-506 parecen intervenir en el bloqueo de la transcripción de un grupo de genes durante la fase de activación temprana de la célula T, entre los que se incluyen el *c-myc* proto-oncogen y aquellos que codifican las IL-2, IL-3, IL-4, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), tumor necrosis factor alfa (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ). Sin embargo, ambas drogas no afectan a la transcripción de genes durante la fase tardía de activación de la célula T, tales como el tumor necrosis factor beta (TNF- β), receptor de IL-2 y receptor de transferrina, **Hanke**⁹⁶, **Mattila**¹⁶³, **Metcalfe**¹⁷⁰, **Tocci**²⁴⁹.

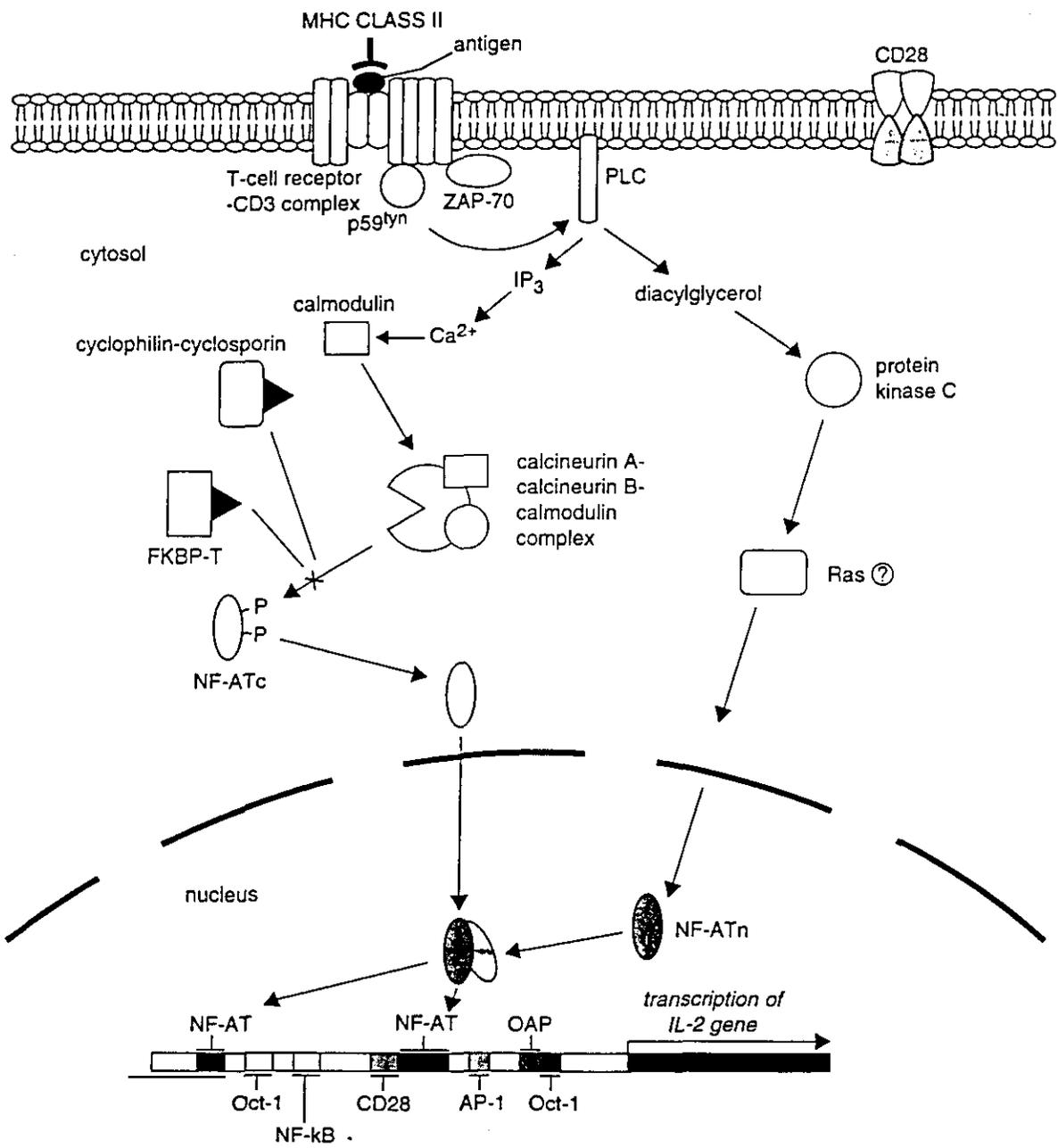


Fig. 7. Mecanismo de acción de FK 506.

FK-506 puede también intervenir selectivamente en la degradación de IL-2 y GM-CSF de las células T, lo que confirma su actividad reguladora de la expresión inmunogenética no sólo a nivel transcripcional sino también postranscripcional, **Hanke**⁹⁶.

6.e.- PROPIEDADES INMUNOLOGICAS

La activación de la célula T en respuesta al reconocimiento antígeno-específico por los receptores de ésta, ha sido asociada con la adhesión celular, con el incremento del turnover del fosfatidil-inositol e incremento de los segundos mensajeros inositol-trifosfato y diacilglicerol (que a su vez producen respectivamente, liberación de calcio del retículo endoplásmico y activación de la proteína quinasa C), así como con la fosforilación de las proteínas citosólicas, **Krensky**¹⁴¹, **Nisbet-Brown**¹⁸⁴. Una vez iniciado, éste proceso bioquímico desencadena la expresión coordinada de los genes celulares, principalmente la expresión de la IL-2, crucial para el crecimiento y proliferación linfocitaria.

Al igual que la CyA, FK-506 no inhibe la adhesión de las células T, **Eiras**⁶¹, ni la generación de los segundos mensajeros, **Bierer**¹⁶, **Fidelus**⁶⁹, ni tampoco el incremento del calcio intracelular, **Jordan**¹²⁶, subsiguiente al reconocimiento antigénico por el receptor celular; sin embargo, FK-506 parece inhibir a los componentes distales de la vía de activación de la célula T, los cuales vinculan el proceso inicial de activación con la fase de expresión genética final, **Sigal**^{225,226}. Es más, FK-506 posee selectividad para bloquear específicamente aquellos puntos que en la vía de activación están íntimamente relacionados con el calcio.

I. Efectos sobre las células T

En el timo, las células T, a medida que emigran desde el córtex a la médula, van adquiriendo las características de antigenicidad y maduración necesarias para ejercer su función inmunológica, momento éste en el que son vertidas a la circulación sanguínea. FK-506 es capaz de inhibir la diferenciación y proliferación de estos linfocitos, así como su producción de linfocinas, **Pugh-Humphreys**²⁰³, **Thomson**²⁴⁸.

In vitro, FK-506 ha demostrado ser 10 a 100 veces más potente que la CyA. Diferentes estudios indican que esta droga inhibe la activación calcio-dependiente de la célula T, la cual se desencadena, a través del complejo receptor CD3 de la célula T, **Jiang**¹²³, del receptor de superficie CD2 de la misma célula, **Bierer**¹⁷, y de la combinación de protein-kinasa C activada junto con la afluencia de calcio en el citoplasma celular, **Kay**¹³⁰. Por el contrario, FK-506 no tiene efecto sobre la activación celular calcio-independiente como sería la desencadenada por la molécula de superficie CD28 o por la activación de protein-kinasa C sólo, **Kay**¹²⁹.

También está descrito que FK-506 actúa bloqueando la división entre la fase de descanso (G0) y la fase de activación (G1) del ciclo celular (que es calcio-dependiente) de la célula T, e inhibe la fase temprana de la transcripción genética de citocinas celulares. A consecuencia de ello, este efecto antiproliferativo se observa sólo cuando la droga se añade en las primeras horas de estimulación de la célula, **Henderson**¹⁰².

De este modo, este fármaco, es capaz de producir una inhibición selectiva en la expresión de citocinas por las células T, estimuladas antigénica o mitogénicamente, suprimiendo así la expresión genética de IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IFN-gamma, TNF-alfa, y producción de GM-CSF, **Anderson**⁶, **Kino**¹³⁴ y quedando inafectada la producción de aquellos genes cuya transcripción se produce en una fase más tardía, como son los que expresan la síntesis del receptor de IL-2, y receptor de transferrina, **Kino**¹³⁴, así como de IL-1, **Dumont**⁵⁷, IL-6, **Yoshimura**²⁷⁵, e IL-10, **Wang**²⁶³.

Otros experimentos *in vitro* han demostrado que FK-506 es capaz de suprimir la reacción o cultivo mixto de linfocitos, que consiste en la producción de linfocitos citotóxicos contra estímulos alogénicos. Esto indica que una de las acciones de esta droga en la respuesta inmunitaria celular, afecta directamente a la proliferación celular secundaria a un estímulo aloantigénico, **Beck**¹⁴. Por otro lado tanto la citotoxicidad celular, mediada por células Natural Killer (NK) y Killer (K), como la humoral, mediada por anticuerpos, son inafectadas por la acción de esta droga, al igual que la proliferación secundaria de linfocitos T en respuesta a IL-2, **Markus**¹⁶⁰.

In vivo, FK-506 es aproximadamente 10 veces más potente que la CyA en suprimir la producción de anticuerpos célulaT-dependiente y la reacción injerto-contra-huésped y en retrasar la reacción de hipersensibilidad en el ratón, Kino¹³³.

II. Efectos sobre las células B

La respuesta proliferativa de células B humanas y de carnero, se ve afectada por este fármaco a la misma concentración capaz de inhibir la acción de las células T.

In vitro, esta droga bloquea la producción de IgM e IgG de los linfocitos B humanos previamente estimulados antigénica o mitogénicamente, pero no inhibe la producción de IL-6 (factor estimulante de células B) dependiente de linfocitos T, ni la de IL-6 inducida por IgM e IgG.

In vivo, FK-506 suprime la producción de IgM de células plasmáticas de carnero y ratas. Esta acción se atribuye en parte a la inhibición en la producción de linfocinas de las células T activadas y en parte a la acción que éste fármaco posee de inhibir directamente la activación calcio-dependiente de la célula B; aunque, por otro lado también se haya descrito una probable acción inhibitoria de la proliferación de linfocitos B, en respuesta a ciertos estímulos calcio-independientes como son la protein-kinasa C y la IL-2.

En contraste con las células T, FK-506 bloquea la división celular en la fase tardía de activación (G1) del ciclo celular. De este modo, la supresión de la proliferación celular B se evidencia sustancialmente cuando la droga se administra a partir de las 24 horas del estímulo proliferativo con anti-IgG, a diferencia, como se ha mencionado anteriormente, de la acción sobre linfocitos T, que se observa unicamente dentro de las primeras horas de la estimulación celular T, debido a que la droga actúa en este caso sobre la fase temprana de activación del ciclo celular.

III. Efectos sobre células no linfoides

Diversos experimentos demuestran que, sólo a concentraciones mucho mayores de las requeridas para inhibir la proliferación de las células T, FK-506 suprime parcialmente la liberación de IL-1-alfa de los monocitos activados humanos y de los macrófagos alveolares, **Keucho**¹³¹, e inhibe la producción de TNF-alfa también de los monocitos activados antigénica y mitogénicamente, **Andersson**⁶. Por tanto, puede concluirse en este aspecto, que las concentraciones de este fármaco, que deprimen marcadamente la proliferación linfocitaria T, apenas son capaces de modificar la función fagocítica de los monocitos, **Woo**²⁷².

En otro aspecto, ha sido demostrada la interferencia de esta droga en diversos eventos celulares de linaje hematopoyético, como la liberación de serotonina e histamina, Ig E-dependiente, por mastocitos de rata, **Hultsch**¹⁰⁸, mastocitos cutáneos humanos, y basófilos también humanos, así como por neutrófilos, **De Paulis**⁵¹. También queda demostrada su actividad antiinflamatoria con la inhibición de prostaglandina D2 en mastocitos de piel humana estimulados por anti-Ig E y con el bloqueo de la liberación de leucotrieno C4 de basófilos humanos y mastocitos alveolares, **De Paulis**⁵⁰.

In vivo, FK-506 atenúa la eosinofilia pulmonar inducida antigénicamente, en el cobaya, **Morris**¹⁷⁸, así como la producción de factor activador de plaquetas y leucotrieno B4. Sin embargo, la activación plaquetaria mediada por calcio y su agregación no se ve afectada por esta droga, lo que indica que la sensibilidad a FK-506 no es una característica universal de las células de linaje hematopoyético, **Johnson**¹²⁴, **Pelekanou**¹⁹².

En cuanto a las células progenitoras sanguíneas, este fármaco demuestra tener un efecto estimulante directo sobre las mismas, estimulando el crecimiento de unidades formadoras de colonias de eritrocitos, granulocitos y macrófagos, **Hirao**¹⁰⁵.

6.f.- DOSIS Y VIAS DE ADMINISTRACION

Al igual que ha ocurrido con la CyA, el régimen de tratamiento con Tacrolimus varía considerablemente según los diversos órganos a trasplantar, y está siendo modificado continuamente en un intento de minimizar los efectos secundarios asociados, que en la mayoría de los casos son dosis-dependientes.

A nivel clínico, la mayoría de los trasplantes hepáticos y renales se han realizado utilizando como vía de administración preferente la vía intravenosa y comenzando la infusión del fármaco tras la revascularización del injerto, prolongándose su administración hasta que la terapia pueda continuarse vía oral. Inicialmente las dosis utilizadas en estos trasplantes fueron de 0.075 mg/Kg en infusiones de 2-4 h dos veces diariamente. Recientemente sin embargo, y en un intento de reducir las altas dosis plasmáticas de la droga, el Tacrolimus se administró vía venosa a una dosis menor o igual a 0.1mg/kg/24h, **Klntmalm**¹³⁶.

El paso a terapia oral se hace normalmente dentro de los 4 primeros días post-trasplante, y la dosis utilizada con mayor frecuencia en la clínica es de 0.15 mg/Kg/12h, a pesar de que las dosis óptimas se ajustan al máximo a las características clínicas del paciente así como a su función hepática y renal y a las concentraciones de Tacrolimus alcanzadas en plasma y sangre. Para obtener un manejo más ajustado de la dosis del fármaco y su aplicación a cada caso, se ha diseñado un programa informático capaz de seleccionar la dosis óptima calculada en relación a múltiples parámetros y características del enfermo trasplantado, **Mc Michael**¹⁶⁸.

Los requerimientos de FK generalmente van disminuyendo con el tiempo, aunque en cualquier caso es necesario mantener siempre una terapia a largo plazo para evitar el rechazo.

Estudios recientes comparativos entre pacientes pediátricos y adultos han revelado necesidad de mayores dosis de mantenimiento en la población infantil en un seguimiento de un año post-trasplante de hígado, **McDiarmid**¹⁶⁷.

En la mayoría de los casos no se contemplan tratamientos preoperativos con Tacrolimus, aunque inicialmente se hicieron pruebas en trasplantados renales aplicando una terapia corta de 0.15 mg/Kg/en una ó dos dosis, 2 días previos al trasplante.

La administración conjunta de este fármaco con otras drogas deberá hacerse con precaución, principalmente si son metabolizados vía citocromo P40 IIIa. Igualmente deberá evitarse la administración conjunta con CyA por la sumación del potencial nefrotóxico de ambas drogas.

En el ámbito experimental han sido múltiples las dosis ensayadas así como las diferentes vías de administración (vía oral, intramuscular, intravenosa e intraperitoneal) utilizándose para ello principalmente ratas, pero también otros animales como ratones, hamsters, cabras, perros, cerdos y monos.

En ratas, **Ochia**¹⁸⁸, administra la droga a 0.32 y 1.0 mg/Kg/día i.m., alcanzando en ambos grupos, un 100% de supervivencia en el trasplante alogénico cardiaco. **Inamura**¹¹⁰, en el mismo animal, consigue prolongar la supervivencia en el trasplante alogénico de piel, utilizando dosis de 0.32mg/Kg/día, también i.m., confirmándose que dicha dosis es óptima para obtener un adecuado efecto inmunosupresor en la rata, sin llegar a producirse efectos secundarios significativos. Esto queda demostrado en el estudio realizado por **Nalesnik**¹⁸¹ que utilizando dosis que van de 1.0 a 4.0 mg/Kg/día i.m., en ratas, describe como efectos secundarios una pérdida de peso inicial, que luego se recupera, un incremento de niveles de glucosa y una disminución del tamaño del timo dosis-dependiente. Sí se mencionan sin embargo, efectos nefro y hepatotóxicos a dosis más altas en el mismo animal.

En el perro, varios autores como **Ochia**¹⁸⁶ y **Collier**³⁶, demuestran que dosis orales de 1.0 a 1.5 mg/Kg/día son suficientes para suprimir el rechazo en el trasplante renal alogénico, aunque varios animales presentan evidencia histológica de vasculitis aguda, que no se ha descrito hasta el momento en ratas, y que afectando a arterias coronarias ha sido causa de muerte en estos animales. En contraste con este hallazgo, **Collier**³⁶, realiza un estudio paralelo de trasplante renal en perros tratados con dosis inferiores de FK506, haciéndose evidente que dosis orales de 0.5

mg/Kg/día no previenen el rechazo renal, aun cuando sí se observan casos de vasculitis. Estos investigadores defienden que la vasculitis puede producirse igualmente en animales no tratados, **Toddo**²⁵⁰.

6.g.- ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En general, puede decirse que la administración de FK durante periodos cortos post-trasplante, es efectiva en la prevención del rechazo de aloinjertos en diversos modelos experimentales a dosis 10 a 100 veces menores que las utilizadas con CyA. Así, en la rata y perro, dosis de FK de 0.1 a 0.3 mg/Kg/día i.m. ó de 1.0 a 1.5 mg/Kg/día v.o., son suficientes para suprimir el rechazo de trasplantes alogénicos de hígado, riñón, corazón y piel, **Sato**²¹².

Estudios realizados con animales indican que la supervivencia del injerto en ellos se obtiene únicamente con la administración postoperatoria del fármaco, como queda demostrado con el hecho de que FK-506 consiguiera prolongar la supervivencia de trasplantes cardiaco, pulmonar, renal y hepático en la rata y perro, incluso comenzando a administrar el tratamiento inmunosupresor hasta 3 y 4 días después de realizado el trasplante, **Katayama**¹²⁸, frente a experimentos en los que la administración de FK al donante o receptor se realizó antes de llevar a cabo el trasplante, no obteniéndose con éxito la prolongación de la supervivencia del injerto, **Fabrega**⁶⁶.

La posibilidad de inducir tolerancia inmunológica con una terapia corta de FK a altas dosis ha sido descrita tanto en trasplante alogénico en ratas (piel, corazón, páncreas, hígado, intestino delgado y pulmón), como en otros trasplantes (hígado y riñón) realizados en animales de mayor tamaño, **Gotoh**⁸⁴.

El trasplante hepático ha sido muy experimentado en animales obteniéndose supervivencia superior a 100 días en ratas, perros y monos. Se han utilizado terapias cortas y de mayor duración post-tasplante, siendo más efectivas las primeras, **Gotoh**⁸³. Por otro lado, mediante FK-506 se ha

conseguido prolongar la supervivencia en un trasplante hepático ortotópico realizado entre una rata y un hámster, **Valdivia**²⁵⁹.

El trasplante renal se ha realizado con éxito en ratas, perros y chimpancés, obteniéndose una prolongación de su supervivencia que va de 16 días a 176 tras la utilización de terapia post-trasplante con FK, **Griffin**⁸⁶.

Otros órganos han sido trasplantados igualmente con éxito en animales gracias a la inmunosupresión obtenida con este fármaco. Así, el trasplante alogénico cardiaco se ha realizado no sólo en ratas y perros sino también en primates como chimpancés y monos, **Hildebrandt**¹⁰³.

Por otro lado, en roedores, perros y monos se ha conseguido también prolongar la función y supervivencia del páncreas trasplantado, **Gotoh**⁸³, **Ericzon**⁶², y en ratas y perros la de intestino delgado, **Hatazawa**⁹⁹. El trasplante alogénico de piel en ratas y ratones, el trasplante corneal en conejos, **Kobayashi**¹⁴⁰, el de miembro vascularizado en ratas, **Kuroki**¹⁴³, y el de pulmón en ratas y perros, **Hirai**¹⁰⁴, han demostrado, como los referidos previamente, una mayor prolongación en el tiempo de supervivencia respecto a CyA al ser tratados con FK. Por último, recientemente se han realizado en Japón los primeros trasplantes de nervio periférico en ratas cuya inmunosupresión se ha conseguido con éxito mediante terapia corta con FK-506, **Hoto**¹⁰⁶, produciéndose en uno de los casos el rechazo al suprimir la terapia con este fármaco.

6.h.- EXPERIENCIA CLINICA

En la valoración de la eficacia clínica de una droga inmunosupresora debería incluirse siempre no solo la valoración del paciente, tanto donante como receptor, sino también la supervivencia del injerto y las características del rechazo en el caso de que éste se produjera. Es importante tener en cuenta todos los elementos y condiciones que intervienen en el proceso del trasplante, en su evolución y en su resultado, ya que con frecuencia puede observarse una diferencia importante entre los datos teóricos del diseño experimental y los

resultados obtenidos en la ulterior aplicación clínica del fármaco inmunosupresor.

Los elementos, cuyo manejo y control cuidadosos, básicamente se asocian al éxito del trasplante, pueden ser divididos en tres categorías relacionadas con el acto quirúrgico:

- El periodo preoperatorio, que incluye la selección de donante y receptor y la selección del injerto compatible.
- El periodo intraoperatorio, que incluye la técnica quirúrgica.
- El periodo postoperatorio, que incluye el manejo y seguimiento del paciente trasplantado.

En lo referente a la selección de posibles candidatos para recibir un trasplante de hígado o riñón, y en ausencia de contraindicaciones absolutas o relativas, los candidatos habitualmente son niños o adultos que presentan enfermedades hepáticas o renales severas e irreversibles y para quienes la alternativa terapéutica médica o quirúrgica no existe o es muy restrictiva (diálisis). Además, principalmente en pacientes trasplantados hepáticos, el pronóstico también depende de la enfermedad primaria, la edad del paciente y la severidad de las condiciones del mismo, **Gordon**⁸¹.

El mayor impacto en la selección del paciente, sin embargo, se ha producido con los últimos avances en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos que intervienen en el proceso global del trasplante. La profundización en esta materia, ha llevado a reconocer la importancia de la histocompatibilidad entre donante y receptor. Es más, el reconocimiento inicial de la relevancia que supone la existencia de grupo sanguíneo (ABO) compatible, seguido del marcaje del sistema antígeno leucocitario humano (HLA), y el evitar trasplantes entre individuos previamente sensibilizados con anticuerpos preformados, ha supuesto la contribución más importante en el éxito de la cirugía del trasplante, **Diethelm**⁵⁵. A esto, recientemente se han añadido otros elementos también decisivos en la consecución del éxito del trasplante, como son los avances en las técnicas quirúrgicas y la utilización de agentes inmunosupresores de mayor efectividad, tales como CyA, y más actualmente FK 506.

La importancia del tipaje tisular previo a la selección del receptor, se establece principalmente en el trasplante intrafamiliar, y de hecho, existe controversia con respecto a su valor en receptores de órganos procedentes de cadáveres. Sin embargo, la existencia de mejoras en la supervivencia de injertos hepáticos de donantes cadáveres sin nexo familiar con el receptor, y en los que se había realizado un marcaje del complejo HLA tipos I, **Yagihashi**²⁷³, e igualmente, la existencia de mejores supervivencias en trasplantes renales de cadáveres no relacionados genéticamente y en los que también se realizó un estudio tisular HLA Tipo I y II, **Opelz**¹⁹⁰, han dejado patente la importancia de hacer un estudio tisular previo, (HLA) a la selección de donante y receptor para garantizar una mayor supervivencia del injerto tanto en órganos procedentes de cadáveres como de miembros genéticamente relacionados.

De forma similar, las pruebas cruzadas para linfocitos citotóxicos realizadas en receptores hepáticos fueron consideradas inicialmente como intrascendentes, hasta que experiencias posteriores demostraron una disminución en la supervivencia de aquellos injertos en los que se había podido demostrar la existencia de anticuerpos preformados. Por todo ello, recientemente se ha destacado la importancia de hacer estas pruebas cruzadas entre donante y receptor que confirmen la compatibilidad inmunológica entre ambos, disminuyendo la posibilidad de acortar el tiempo de supervivencia del injerto, **Nakamura**¹⁷⁹, **Takaya**²⁴¹.

Sin embargo, y a pesar de todas las experiencias existentes y la amplia variedad de trabajos que atestiguan la necesidad de hacer un estudio y tipificación inmunológica, garantizando una compatibilidad del sistema sanguíneo ABO, complejo HLA y pruebas cruzadas linfocitotóxicas, en ocasiones y a menudo con relativa frecuencia, la urgencia habitual asociada a la necesidad del trasplante, la amplia variedad de antígenos HLA expresados y la escasa disponibilidad de órganos, hacen que no siempre pueda ser realizado un tipaje exhaustivo y completo del órgano a trasplantar quedando sujeto éste en gran parte de las ocasiones, al juicio clínico y las circunstancias en que se desarrolle la necesidad del trasplante en cada caso particular.

En cuanto a la selección del donante, la mayoría de los órganos se obtienen de cadáveres, aunque algunos provienen de donantes vivos. En

algunos países como Japón la donación de órganos de pacientes cerebralmente muertos no es del todo aceptada, incluso en este mismo país el trasplante procedente de cadáveres todavía es muy inferior a los realizados en otros muchos países.

En lo referente a la preservación de órganos, los mayores avances se deben a la introducción de la solución de la Universidad de Wisconsin en 1987. Esta solución ha ampliado la preservación del riñón a 50 horas con perfusión pulsátil y de 35 a 40 horas si se almacena en frío. La preservación hepática actualmente es posible durante 24 horas, **Diethelm**⁵⁵, aunque parece ser que una conservación del órgano por más de 18 horas se asocia a un mayor riesgo de fallo del injerto, **Morel**¹⁷⁷.

La eficacia clínica de Tacrolimus ha sido evaluada principalmente en centros especializados en trasplantes en USA, Japón y Europa, siendo la mayor experiencia clínica con este fármaco la aportada en la Universidad de Pittsburg, Pennsylvania en USA.

Los resultados de los ensayos clínicos realizados con Tacrolimus deberían ser analizados estrechamente. La razón es la existencia de un vasto número de investigaciones con resultados publicados que no siempre han sido sometidos a una ulterior revisión. **Jain**¹⁷⁷ en relación a esto, describe una mayor incidencia de rechazo dentro del primer trimestre que sigue a la cirugía, y sin embargo otros investigadores han publicado como favorables, resultados de supervivencia de un injerto tras un seguimiento exhaustivo en un periodo postrasplante inferior a tres meses.

En las investigaciones clínicas evaluadas normalmente se empieza el tratamiento con Tacrolimus nada más revascularizarse el injerto, administrándose inicialmente de forma i.v. hasta que pueda ser aplicado el tratamiento v.o. Es más, en la mayoría de los casos ambas formas se solapan durante 1 ó 2 días. En cuanto a la pauta posológica más habitual en la experiencia clínica, recientemente ha sido modificada en un intento de reducir la magnitud de la dosis inicial postrasplante, administrada vía intravenosa y prolongar la aplicación diaria de fármaco vía oral para disminuir los potenciales efectos secundarios. El régimen más comunmente utilizado incluye administración i.v. de Tacrolimus en una

dosis de 0.1 á 0.15 mg/Kg/día hasta que el inicio de terapia oral a dosis de 0.3 mg/Kg/día sea factible. Sin embargo, debería tenerse en cuenta que la posología óptima del Tacrolimus, como se ha referido, está siendo continuamente modificada y ajustada, de hecho, una experiencia muy reciente indica la utilización de dosis inicial i.v. menores o iguales a 0.1 a 0.2 mg/Kg o 0.035 á 0.075 mg/Kg/día seguidas de dosis orales de 0.1 á 0.2 mg/Kg/día, **Klntmalm**¹³⁹.

El ajuste de dosis en los estudios evaluados normalmente se realiza midiendo las concentraciones plasmáticas del fármaco y valorando la función hepática y renal. La mayoría de los ensayos realizados administran una terapia de mantenimiento con corticoides, y tratan el rechazo incrementando las dosis del fármaco inmunosupresor primario, y añadiendo altas dosis de esteroides y/o preparaciones antilinfocíticas.

6.i.- TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS

FK-506 ha demostrado claramente ser un potente inmunosupresor, sin embargo diversos estudios experimentales tanto en ratas como en perros, ponen de manifiesto que el fármaco no está exento de toxicidad y efectos secundarios adversos.

La aparición de pérdida de peso en la rata de Lewis al iniciar un tratamiento con altas dosis de FK-506 es uno de los primeros efectos que se aprecian en experimentos con ratas trasplantadas, **Naleskik**¹⁸². Con la misma dosis estos animales recuperan su peso normal casi por completo en tan sólo dos semanas más. También se ha descrito una reducción del peso del timo dosis-dependiente, consistente en una atrofia medular similar a la producida por la CyA y que pone de manifiesto la influencia de ambas drogas en el sistema inmunosupresor.

En el mismo estudio con ratas, ha sido demostrada una tendencia a presentar niveles elevados de glucosa en sangre, lo que parece corresponder a un incremento en el recambio de las células acinares pancreáticas e incluso en ocasiones existencia de necrosis de las mismas.

Por otro lado y a pesar de haberse hallado eosinofilia perivascular en el pulmón, no existe evidencia clinicopatológica de vasculitis en este estudio, en contraste con los resultados obtenidos en estudios con perros donde la toxicidad vascular representa una real e importante limitación a la hora de utilizar esta droga.

En ratas, la administración conjunta de FK y CyA en animales sometidos a isquemia renal, muestra que FK tiene menor nefrotoxicidad que la CyA, **Todo**²⁵².

En perros que reciben dosis orales de FK, se han descrito vómitos e importante emaciación dosis-dependiente. Sin embargo, el efecto secundario más importante es la vasculitis, que se observa en pequeñas arterias en las que se produce necrosis de la media a veces tan severa que desencadena necrosis focal o infarto cardiaco. Esto no se observa en ratas ni siquiera recibiendo dosis mucho más altas de FK.

Todo lo descrito hace suponer que la toxicidad de esta droga puede ser un fenómeno especie-específico, puesto que cambios histopatológicos importantes observados en el perro no se desarrollan en la rata, salvo pequeños alteraciones en el páncreas, ya que ambos presentan necrosis acinar, aunque de una forma mucho más leve en las ratas.

Podemos concluir que FK-506 es el mayor inmunosupresor conocido hasta el momento. No exento de toxicidad, ésta es importante en el perro, menor en ratas y desconocida en primates. Sin embargo en pequeñas dosis, no existe toxicidad ni siquiera en perros. Además, este fármaco puede ser utilizado en combinación con CyA, esteroides y presumiblemente otras drogas, por lo que su toxicidad puede aún verse más reducida.

FK-506, comercializado con el nombre de Tacrolimus, ha demostrado también que puede ser aplicado clínicamente, habiendo sido evaluada su eficacia en centros especializados en trasplante de USA, Japón y Europa. Además de comprobar sus importantes propiedades inmunológicas en seres humanos, estos estudios han permitido conocer con mayor exactitud la tolerabilidad y efectos secundarios de esta droga

tanto en pacientes recién tratados, como retrospectivamente, en aquellos que recibieron inicialmente el mismo fármaco.

La interpretación del perfil de tolerabilidad de FK no es fácil debido a la variedad de dosificaciones utilizadas clínicamente, de hecho la mayoría de los efectos adversos descritos están siempre referidos a la dosis utilizada. En general, la toxicidad es dosis dependiente, aunque algunas reacciones, tales como el desarrollo de disartrias, son idiosincrásicas o requieran múltiples factores para manifestarse, no relacionándose tan directamente con la dosis del fármaco, **Fung**⁷⁶.

Los principales efectos adversos descritos con Tacrolimus en seres humanos son la nefrotoxicidad, las infecciones y las complicaciones malignas como neurotoxicidad y diabetogénesis, efectos todos que han sido descritos en otras terapias inmunosupresivas, incluyendo la CyA, **Faulds**⁶⁸.

La tolerabilidad de esta droga en pacientes trasplantados ha sido similar en receptores adultos y en niños, **Tzakis**²⁵⁷.

La incidencia, la presentación clínica y las características de la nefrotoxicidad producida por Tacrolimus en pacientes trasplantados, se considera idéntica a la derivada del uso de CyA, **McCauley**¹⁶⁵. Así, fue similar la incidencia de casos que debido a la nefrotoxicidad precisaron la retirada de ambos fármacos. Igualmente, los requerimientos de hemodiálisis en otro estudio, fueron similares para ambas drogas, **Klintman**¹³⁷, **European Study Group**⁶⁵.

La mayoría de los receptores tratados con Tacrolimus han manifestado nefrotoxicidad aguda (caracterizada por aumento de creatinina en el primer mes de tratamiento), **Stock**²³⁴. La nefrotoxicidad crónica (en la que el aumento de creatinina persiste después de un mes de tratamiento) se describió en un 30 á 50% de los pacientes sometidos a trasplante y tratamiento inmuno-supresor con FK, **Porayko**²⁰².

Diversos estudios han permitido comprobar que la nefrotoxicidad puede disminuir al reducirse la dosis de Tacrolimus utilizada, sin embargo, no existe una relación claramente directa entre niveles de

Tacrolimus en sangre y alteración de los parámetros que miden la función renal. A pesar de ello, existen estudios más recientes que demuestran mayor incremento de niveles de creatinina en sangre al utilizar dosis mayores de esta droga. De estos hallazgos se deduce que la toxicidad renal asociada al uso de FK-506, puede aparecer no sólo con la utilización de dosis elevadas del fármaco, sino incluso al utilizar dosis dentro de un rango terapéutico como óptimo, **Japanese FK506 Study Group**¹²⁰.

CyA y Tacrolimus parecen inducir nefrotoxicidad con una incidencia muy similar, sin embargo, aunque la variación en los niveles de creatinina en sangre en los trasplantados se describe también por igual, y los cambios histológicos sean muy similares, para ambas drogas, **Randahawa**²⁰⁵, recientes estudios han puesto de manifiesto que los efectos producidos sobre el filtrado glomerular en un riñón que ha recibido tratamiento con ambas drogas son, a largo plazo, menos severos para los tratados con Tacrolimus, aunque todavía serán necesarios nuevos estudios que apoyen histológicamente esta afirmación.

La infección sigue siendo una de las principales complicaciones causantes de morbi-mortalidad importante en pacientes trasplantados. En un estudio reciente con 110 pacientes receptores de un hígado y sometidos a terapia con FK, se apreció una tasa de infección cercana al 50%, de la cual el 38% sufrió infección catalogada como severa (neumonía, peritonitis y colangitis entre otras). La mayoría de los casos fueron de etiología bacteriana, siendo el cytomegalovirus la infección vírica más frecuentemente presentada. Las infecciones fúngicas fueron menos comunes predominando la candidiasis y la aspergilosis, **Torre-Cisneros**²⁵⁴.

Estudios comparativos que se han realizado en pacientes generalmente trasplantados de hígado, utilizando la CyA y el Tacrolimus como inmunosupresores, han puesto de manifiesto que la frecuencia de infecciones de diferentes categorías fué considerablemente menor para Tacrolimus, **Esquivel**⁶⁴. No sólo se ha asociado este fármaco a una menor incidencia de bacteriemia, (quizá relacionada con la menor necesidad de corticosteroides de apoyo en el tratamiento), sino que también ha sido menor la incidencia de infecciones fúngicas y por cytomegalovirus respecto a la presentada en pacientes tratados con CyA, **Sakr**²¹⁰.

Se han desarrollado trastornos linfoproliferativos post-trasplante en una proporción similar para ambas drogas, (menor a un 2%), existiendo en ambos casos una fuerte asociación entre estos trastornos e infección concomitante por virus de Epstein-Barr, **Nalesnik**¹⁸¹. En relación a esto, ha sido descrito en esta droga un potencial mutagénico, *in vitro*, sobre linfocitos humanos utilizando dosis supraterapéuticas, **Yu**²⁷⁸.

Los efectos adversos neurológicos asociados al uso de FK en pacientes postransplantados, se presentan con mayor frecuencia al administrar el fármaco vía venosa. Estos efectos pueden ser clasificados como mayores (mutismo acinético, afasia, ataques, confusión, psicosis, encefalopatía y coma persistente entre los más importantes), y como menores (temblores, cefalea, alteraciones del sueño, pesadillas, disestesias o ftofobia, entre otros), **Eidelman**⁶⁰.

La toxicidad neurológica mayor ha sido descrita en el 10% de los pacientes sometidos a estudio, frente al 20% que presentaron síntomas menores. En la mayoría de los casos sin embargo, la toxicidad es un fenómeno reversible que se resuelve disminuyendo la dosis o bien sometiendo al paciente a una terapia discontinua.

La tasa de incidencia de estos efectos adversos con FK fué similar a la presentada en terapias con CyA, cuya aparición también se relaciona con la vía de administración intravenosa, **Klntmalm**¹³⁸.

La aparición de hiperglucemia en pacientes post-transplantados y tratados con Tacrolimus, requirió insulina en un 15% después de 3 meses de iniciado el tratamiento y en un 20% a los 6 meses del mismo, disminuyendo a un 5.5% para los tratamientos prolongados más de 1 año. Más allá de 18 meses ningún paciente requirió insulina en este estudio, **Tabasco-Milligan**²⁴⁰.

Sin embargo, la incidencia de hiperglucemia fué mayor en pacientes tratados con Tacrolimus respecto a los que recibieron CyA, **European FK506 Study Group**⁶⁵.

La incidencia de diabetes de comienzo reciente en relación al tratamiento con FK fué muy baja, (2%) tanto en pacientes pediátricos como en adultos, **Carrol**³¹.

Otros efectos adversos han sido descritos con este tratamiento inmunosupresor, así, la aparición de hipertensión es casi constante en los pacientes trasplantados, con una incidencia similar para los tratados tanto con FK como con CyA, **European FK506 Study Group**⁶⁵. Sin embargo, el número de pacientes diagnosticados de hipertensión en relación a su trasplante y que pudo abandonar posteriormente la medicación para tratarla, fué mayor en pacientes tratados con Tacrolimus, **Shapiro**²²¹.

La hiperplasia gingival y el hirsutismo, comúnmente asociados a la CyA, no parecen ser efectos asociados a la terapia con FK de una forma significativa, **Fung**⁷⁶.

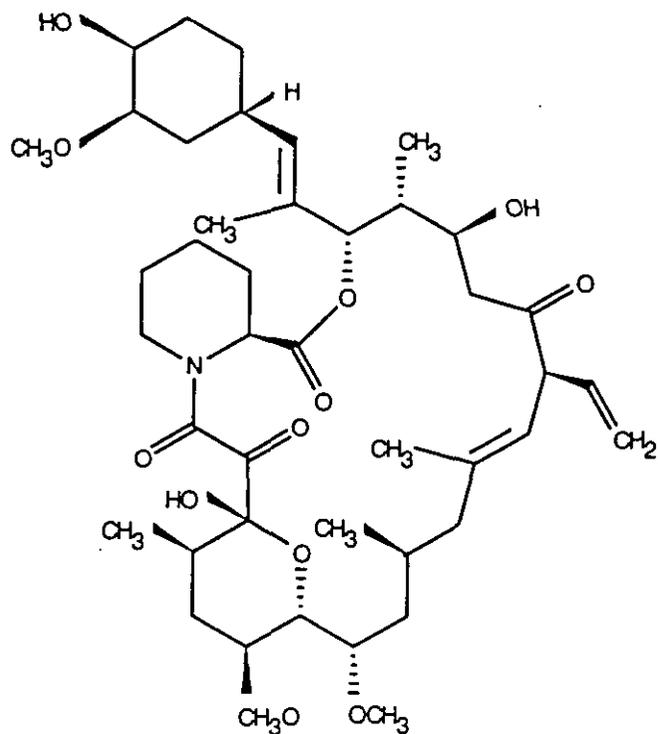
Otros efectos poco frecuentemente asociados a Tacrolimus fueron insomnio, temblores, cefalea, sensación de hormigueo, mialgias, prurito, fatiga, fotofobia y síntomas gastrointestinales, **Fung**⁷⁵, de todos ellos, sólo el temblor se ha presentado más frecuentemente con Tacrolimus que con CyA, **Esquivel**⁶⁴.

En sólo 8 de 1400 pacientes, (0.6%), de pacientes que recibieron tratamiento con FK, se produjo anemia hemolítica, descrita también en tratamientos con CyA, **Abu-Elmagd**¹.

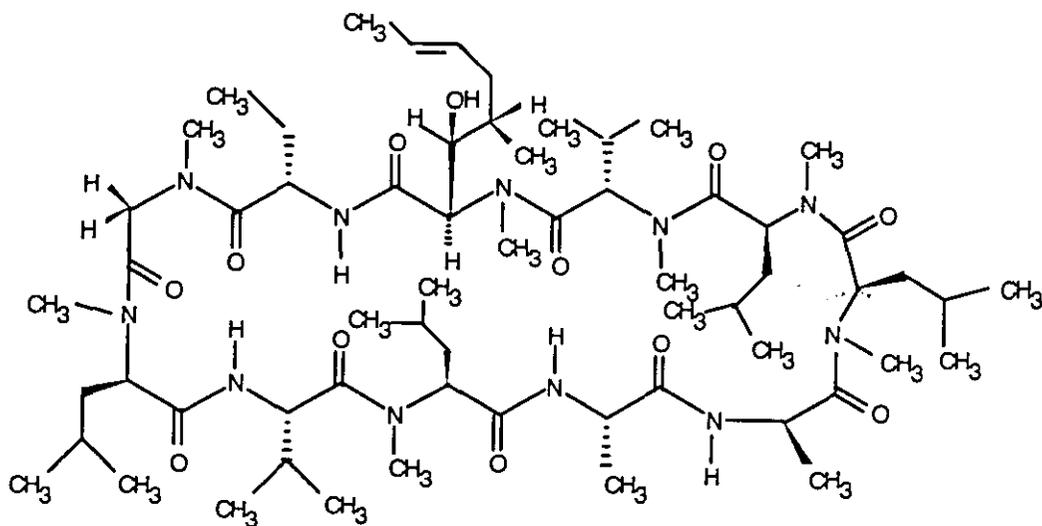
6.j.- COMPARACION DE FK-506 CON CyA

Tanto FK 506 como CyA son dos drogas que presentan un espectro similar en cuanto a sus propiedades inmunosupresoras, a pesar de ser estructuralmente diferentes, como se ilustra en la Fig. 8, sin embargo, FK 506 ha demostrado ser *in vivo*, 100 veces más potente en inhibir la activación de células T respecto a la CyA.

En cuanto a sus propiedades farmacodinámicas, dentro del mecanismo intracelular de acción, ambas drogas presentan alta afinidad por las llamadas inmunofilinas o proteínas intracitoplasmáticas de



Tacrolimus



Cyclosporin

Fig. 8. Estructura bioquímica de FK 506 y CyA.

células inmunológicas. El complejo formado por esta unión se ha considerado como la señal biológica que interactúa con las moléculas intracelulares implicadas en la señal de transducción que producirá el efecto inmunosupresor de ambas drogas. Igualmente, los dos fármacos bloquean la transcripción de un pequeño número de genes durante la fase temprana de activación de la célula T, genes que codifican sustancias estimulantes de la respuesta inmunitaria como son las interleukinas 2, 3, y 4, **Hanke**⁹⁶.

Experimentalmente, ciclos cortos de FK 506 postrasplante, han confirmado su eficacia en la prevención del rechazo alógeno a dosis 10 a 100 veces inferiores a las utilizadas en tratamientos similares con CyA, de tal forma que en ratas ha quedado demostrado que dosis pequeñas de FK506 son suficientes para suprimir el rechazo hepático, renal y cardíaco, así como el de piel. En la misma línea experimental, y en contraste con la CyA, FK 506 también ha demostrado ser capaz de suprimir el rechazo agudo cardíaco y de intestino delgado en ratas, **Gotoh**⁸⁴.

El éxito de los trasplantes de órganos ha mejorado significativamente respecto a las pasadas décadas reflejando un avance en muchas facetas de este área quirúrgica entre las que se incluyen la selección del paciente, la técnica quirúrgica, la preservación de los órganos y el manejo postoperatorio. Sin embargo, el mayor impacto en el éxito de los trasplantes se ha producido con la introducción de la CyA. De hecho, mientras solamente uno de cada tres pacientes sobrevivían un año tras la realización de un trasplante hepático en la era anterior a la CyA, desde su aparición, la supervivencia ha aumentado en más del doble. Por otro lado, no es sorprendente comprobar que casi todos los protocolos de tratamiento inmunosupresor postrasplante incluyen CyA, generalmente en asociación con azatioprina y/o prednisona. Para tratar las crisis de rechazo agudo, los esteroides en dosis altas se han mantenido como la modalidad más común de tratamiento, aunque las preparaciones antilinfocíticas se han utilizado como alternativa en los casos de resistencia a esteroides durante los episodios de rechazo agudo, **Klintmalm**¹³⁸.

A pesar de los importantes avances en el área del trasplante, alcanzados durante la época de la CyA, todavía son muchas las mejoras que se esperan en este ámbito. Así, el rechazo (particularmente el rechazo

crónico), las infecciones y la toxicidad de las drogas son los tres problemas de mayor importancia que deberán ser mejorados o solventados en un futuro. De hecho, el rechazo y la infección son las principales causas de morbilidad y mortalidad, concretamente en pacientes que reciben un trasplante hepático. Esta observación refleja la incapacidad de las pautas inmunosupresoras habituales en bloquear selectivamente la respuesta inmunológica al trasplante, dejando intactas otras defensas del huésped, con lo que se evitarían las infecciones como una de las más temidas y frecuentes complicaciones al trasplante de órganos. Además, cada una de las drogas inmunosupresoras presenta serios problemas de tolerabilidad que son intrínsecos a las mismas drogas y, por otro lado, en el caso de la CyA a menudo se hace difícil diferenciar entre un rechazo crónico y nefrotoxicidad debida a la droga en pacientes receptores de un riñón. Por todo ello, no es sorprendente que continúe intensamente la búsqueda de nuevas drogas de mayor efectividad y menor toxicidad, que puedan dar por finalizada la era de la CyA.

En cuanto a la experiencia clínica de la CyA respecto al FK 506, concretamente en experiencias con trasplante hepático y renal que son en ambos casos los más frecuentemente realizadas, se ha comprobado que tanto FK 506 como CyA son más efectivos en suprimir los episodios de rechazo agudo más que los crónicos. Sin embargo, como terapia de rescate, en combinación con corticoides, FK 506 mejora los índices bioquímicos e histológicos de la función del injerto, lo que resulta en un aumento en la supervivencia del injerto para más de un 50% de los pacientes que experimentan rechazo o toxicidad asociada con terapia basada en la CyA. Utilizada esta droga como inmunosupresor primario cuando se combina con corticoides en pacientes trasplantados de hígado, tanto éstos como la supervivencia del injerto, no difieren significativamente para ambas drogas en los dos estudios randomizados más importantes realizados, aunque en uno de ellos ambos indicadores fueron ligeramente mayores para FK 506, **European FK 506 Study Group**⁶⁵.

En otras investigaciones en el mismo ámbito, ésta droga demostró mayores índices de supervivencia tanto del injerto hepático como del paciente respecto a la CyA, lo que refleja, al menos en parte, el marcado efecto hepatotrófico del FK 506. Por el contrario, en el caso del trasplante

renal, los resultados de supervivencia global de injerto y paciente fueron muy similares para ambas drogas, **Shapiro**²²².

En el caso de rechazo de trasplante hepático, e incluso en los casos refractarios, FK 506 utilizado como terapia de rescate, resultó ser bastante más eficaz que la CyA, precisándose dosis menores de corticoides durante estos episodios e incluso pudiendo ser retirados en algún caso, **Todo**²⁵¹.

Tanto para FK 506 como para CyA, los efectos adversos detectados con su uso, además de depender en parte del incremento de las dosis, también tienen una característica idiosincrática que hace más difícil su control en muchos casos. Para ambas drogas los efectos secundarios son muy similares, así, los más destacados son la nefrotoxicidad, infecciones y complicaciones malignas, así como neurotoxicidad y efecto diabetogénico. Cuantitativamente algunos efectos adversos pueden aparecer con menor frecuencia con FK 506 que con CyA. Así, la incidencia de infecciones, parece ser menor con FK 506, así como la aparición de hipertensión e hipercolesterolemia detectadas en algunas investigaciones. Una importante ventaja de FK 506 es su no asociación a complicaciones como hirsutismo e hiperplasia gingival, características frecuentes en la terapia con CyA, dato de considerable importancia en el caso de pacientes infantiles y tratamientos de larga duración, **Esquivel**⁶⁴.

En términos económicos, también ha sido demostrado un coste casi del doble en el tratamiento con CyA en trasplantados hepáticos respecto a los tratados con FK 506. La diferencia puede reflejar distintos tiempos en la duración de la hospitalización y mayores gastos en los cuidados postoperatorios, **Staschak**²³⁰.

En conclusión, el papel de FK 506 en la terapia de pacientes trasplantados de hígado o de riñón, está todavía desarrollándose. Sin embargo, existen estudios numerosos que ya muestran a este nuevo inmunosupresor como una valiosa alternativa terapéutica en pacientes que experimentan rechazo o toxicidad secundaria a los fármacos utilizados y en quienes el trasplante hepático o renal (y la diálisis en el caso del fracaso renal), son a menudo la única alternativa. Como terapia inmunosupresora primaria, FK 506 puede ser considerada una opción a CyA, especialmente en pacientes trasplantados de hígado. Queda por

definir su lugar exacto entre los fármacos inmunosupresores disponibles en la actualidad, aunque bien podría ocupar el lugar de la CyA, considerada como la droga inmunosupresora más importante de todos los tiempos hasta nuestros días.

7.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE FIBRAS NERVIOSAS

En 1939 fue *Coons* quien introdujo por primera vez, un nuevo concepto en el diseño de la técnica histoquímica, basado en el uso y aprovechamiento de la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, mediante el uso de anticuerpos acoplados a trazadores fluorescentes. Así se inició el desarrollo de las técnicas inmunocitoquímicas. Actualmente, estas técnicas son de uso común y se han generalizado tanto en la experimentación biológica como en el uso del diagnóstico histopatológico.

La mayoría de los anticuerpos utilizados en las técnicas inmunohistoquímicas pertenecen a las IgGs; grandes glicoproteínas formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuros. Cada molécula completa de IgG posee dos sitios idénticos de unión al antígeno a través del fragmento Fab. El fragmento cristalino, Fc, es capaz de unirse a una gran variedad de moléculas (IgGs, proteína A, etc...), lo cual facilita la visualización de la reacción inmunológica a través del marcaje de estas últimas.

Como ocurre en el caso de todas las técnicas experimentales, para la técnica inmunohistoquímica se pueden describir cinco criterios de fiabilidad, **Petrusz²⁰⁰**, eficacia, exactitud, precisión, sensibilidad, y especificidad.

La eficacia proporciona información sobre la relación que existe entre la intensidad de la reacción específica y el fondo. La exactitud relaciona un valor dado en ensayos cuantitativos, con el valor real. En inmunohistoquímica, la exactitud depende de en gran medida del microscopio que se utilice; en particular, en la técnica del PAP este valor es de 20-80 nm. La precisión se refiere a la reproductibilidad de las medidas. Las técnicas inmunohistoquímicas, una vez estandarizadas, presentan un alto grado de precisión; sin embargo, este valor no puede expresarse

matemáticamente, ya que los resultados están en función de variaciones en la técnica, los reactivos utilizados, la obtención de antisueros, etc... La sensibilidad en inmunohistoquímica se puede definir como la menor concentración de un antígeno presente en un tejido que es posible distinguir del fondo. Finalmente, la especificidad de esta técnica da cuenta de la capacidad del anticuerpo para detectar un determinante antigénico en particular, excluyendo el otro, **Sternberger**²³¹. A pesar de la especificidad del anticuerpo, en la aplicación de la técnica inmunohistoquímica se debe satisfacer también la especificidad del método, es decir, durante el transcurso de la reacción todos los reactivos utilizados han de ser selectivos, de forma que no reaccionen con ningún otro componente tisular.

Aunque existen diversos trazadores enzimáticos que se han utilizado en inmunohistoquímica (fosfatasa alcalina, citocromo oxidasa, fosfatasa ácida, etc...), la peroxidasa de rábano resulta ser el trazador enzimático más ampliamente utilizado. Además de su idoneidad para la detección a nivel de la microscopía óptica, el producto del revelado con diaminobenzidina (DAB), **Karnowsky**¹²⁷, tras su posterior osmificación, resulta opaco a los electrones. La peroxidasa ofrece, además, la posibilidad de ser aplicada en los diversos sistemas de detección indirecta del antígeno, contribuyendo a aumentar la sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica, que desarrollada inicialmente para la microscopía óptica, se puede aplicar a la localización ultraestructural (PAP, Avidina-biotina, intensificación con plata, etc...). El principal inconveniente resulta ser la dificultad en la cuantificación de la reacción y cierta difusión del producto de la reacción que limita, en cierto sentido, su resolución a nivel ultraestructural.

8.- ESTUDIO POR ANALISIS DE IMAGEN DE FIBRAS NERVIOSAS

El análisis de imagen es una técnica que está tomando un impulso cada vez mayor en ciencias biomédicas ya que cuenta con numerosas aplicaciones **Liu**¹⁵⁰ y **Ong**¹⁸⁹. Es en la década de los 80 cuando comienza su utilización en biomedicina ya que anteriormente se aplicaban plantillas y métodos semicaseros para cuantificar estructuras o como máximo se contaba con planímetros para medir áreas, perímetros, número de células etc. El desarrollo de esta tecnología se debe en parte a que el coste de los

ordenadores bajó considerablemente, así como al incremento de la potencia de los mismos y al desarrollo de equipos y tarjetas especializadas para el proceso de imágenes, **Moragas**¹⁷⁶ y **Kisner**¹³⁵.

Las técnicas de análisis de imagen suponen la realización de medidas y la obtención de valores directamente sobre un documento digital, apoyándose sobre imágenes visualizadas en el monitor del ordenador. La digitalización de una imagen consiste en la conversión de un sistema analógico, es decir, sin coordenadas espaciales de referencia y con amplitud continua, a un sistema digital, que es discreto. La imagen, es la función de una magnitud física proyectada sobre una superficie plana, en el caso de imágenes monocromas (tonalidades de gris o blanco y negro). Así, una imagen se define como una matriz de puntos formada por "m" columnas y "n" filas. Cada punto o "pixel" tiene asignado un valor determinado de intensidad, también denominado nivel de gris, según la información almacenada en 8 bits. Un bit sólo puede tomar dos valores, el 0 y el 1, por lo que el número total de posibilidades es (256 posibilidades). Así, el valor de nivel de gris asignado a un "pixel" puede variar entre los valores 0 (negro absoluto) y 255 (blanco absoluto). Una vez digitalizada, la imagen se realiza y mejora con filtros y funciones adecuados para cada aplicación, con el fin de binarizarla (consiste en extraer de la imagen las estructuras que se quieren valorar) y asociarla a procesos tópicos de *morfología matemática* (para realizar medidas, contajes etc.).

9.- ESTUDIO ELECTROFISIOLOGICO DE CONDUCCION NERVIOSA

La monitorización de la transmisión neuromuscular permite cuantificar (mediante registro gráfico o por apreciación visual) la profundidad del bloqueo neuromuscular.

La monitorización de la transmisión neuromuscular, tal como la concebimos hoy en día, se inicia en el año 1941 con los trabajos de *Harvey y Masland*. Desde entonces importantes y variados estudios fueron descritos y discutidos en la literatura médica. Si bien es cierto que *Alí, Gray y Utting* en los años 1970-71 desarrollaron y popularizaron magistralmente el uso del tren de cuatro (4 estímulos sucesivos a la frecuencia de 2Hz) nos

parece justo aquí no olvidar los nombres de *Wilson y Roberts*, de la Universidad de Liverpool, como los pioneros en la introducción del tren de cuatro para la monitorización de la transmisión neuromuscular.

Los trabajos de *Waud y Waud* del año 1971 permitieron establecer interesantes y útiles correlaciones entre los diferentes tests de evaluación de la función neuromuscular y el porcentaje de receptores postsinápticos teóricamente ocupados por un relajante no despolarizante.

En el año 1975, Lee demostró que el tren de cuatro permite cuantificar ciertos niveles de curarización tras la administración de relajantes no despolarizantes, teniendo en cuenta solamente la apreciación visual de los movimientos de los dedos de la mano, sin que fuera necesario recurrir al registro gráfico.

10.- ANATOMIA DEL NERVIO CIATICO DE LA RATA.

El plexo sacro de la rata está formado por parte del cuarto nervio lumbar, el quinto y parte del sexto. Da salida a dos grupos de nervios, un tronco anterior (ventral) y otro posterior (dorsal) que se unen y consolidan en la región pélvica como nervio ciático.

Este tronco nervioso sale de la pelvis por la escotadura ciática y pasa por debajo del músculo glúteo mediano apoyado sobre los gemelos pelvianos y obturadores, luego de encontrarse al músculo piriforme en su camino descendente. El tronco común a menudo está dividido poco después de su origen en dos ramas terminales principales, el nervio tibial y nervio peroneal. Tras la división o incluso antes (esta circunstancia es francamente variable), el ciático pasa sobre los músculos adductores y semimembranoso, delante del semitendinoso y cubierto por el músculo adductor craneal corto y bíceps femoral.

A nivel de la región crural posterior se descubren los nervios tibial y peroneal agrupados en un tronco común junto al nervio sural, rama alta del nervio peroneal, que le sigue en su trayecto. Este tronco común da el aspecto macroscópico de tronco único. Estos nervios recorren unidos el

muslo en toda su longitud, para separarse en la parte alta de la región poplítea, aunque a veces lo hace más proximal.

Por debajo de la rodilla, el nervio peroneal se divide rápidamente en nervio músculo-cutáneo y nervio tibial anterior que van a inervar los músculos anteriores y laterales de la pierna y los músculos dorsales del pie. El nervio tibial da importantes colaterales para los músculos superficiales y profundos de la celda posterior de la pierna, antes de dividirse en nervio plantar mediano y nervio plantar lateral que van a inervar a los músculos plantares del pie, Fig. 9.

11.- OBJETIVOS E HIPOTESIS DE TRABAJO

Desde la realización del primer aloinjerto de nervio periférico en 1878 en humanos, éste ha sido un tema controvertido e incluso desterrado por muchos autores, no hallándose una adecuada aplicación en la clínica hasta el momento. Sin embargo, la idea de poder disponer de tejido nervioso para hacer frente a lesiones de extensión o complejidad importantes, unida a la creciente realización con éxito de trasplantes nerviosos autólogos, ha originado un progresivo interés en el campo del trasplante alogénico.

Dado que la posibilidad de que se produzca el rechazo inmunológico del injerto, constituye el mayor impedimento para que éste se lleve a cabo con éxito, han sido numerosos los intentos de anular la respuesta inmunológica desencadenada tras la cirugía del trasplante. Varios han sido los métodos utilizados, bien aplicados sobre el huésped, bien sobre el mismo injerto para evitar la activación de la inmunidad del receptor. De entre los muchos tratamientos aplicados con mayor o menor éxito, ha quedado patente que en los últimos años el avance en la utilización de drogas inmunosupresoras ha generado gran número de trasplantes con resultados notorios, tanto de forma experimental como en la clínica. Sin embargo, todavía son muchos los efectos secundarios asociados a la utilización prolongada, y a veces a altas dosis, de éstas drogas.

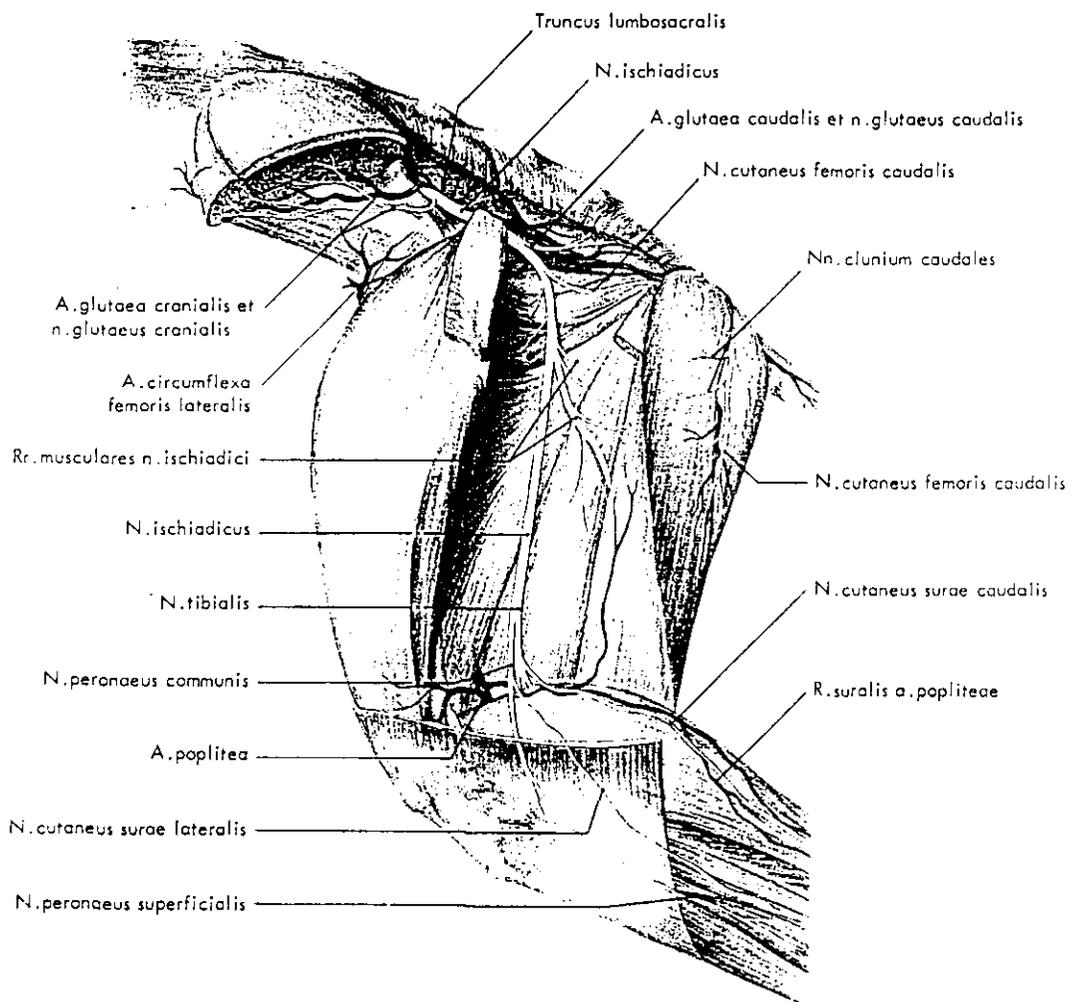


Fig. 9. Anatomía del nervio ciático de la rata.

En esta línea, con nuestra investigación pretendemos evaluar la eficacia de un nuevo fármaco inmunosupresor, con el que se han logrado transplantes con éxito de otros órganos, valorando la efectividad del mismo en el transplante de nervio periférico. Para ello, hemos utilizado ratas de distintas cepas para disponer de tejidos con diferente marcaje antigénico, permitiendo así la posibilidad de reacción de rechazo inmunológico. Del mismo modo, y partiendo igualmente de una situación común en la clínica humana, hemos seccionado un segmento de nervio ciático de rata que posteriormente ha sido transplantado a otra de distinta cepa. Desde el mismo día del transplante, las ratas operadas han sido sometidas a la acción de esta droga diariamente y a dosis relativas a su peso. En base a esto, podemos concretizar nuestro objetivo del siguiente modo:

A) Estudio del patrón celular asociado a la reacción inmunológica de rechazo, en las ratas no tratadas, mediante la utilización de marcadores inmunológicos específicos que permitan identificar cada una de las células implicadas en dicho proceso, y su comparación con el tejido de las ratas inmunodeprimidas. Con ello pretendemos demostrar que, al estar la fibra nerviosa libre de la reacción inflamatoria asociada al rechazo, se consigue regenerar el nervio trasplantado en los animales tratados.

B) Estudio de la regeneración nerviosa, llevando a cabo un análisis morfométrico de la fibra nerviosa regenerada bajo la acción del fármaco inmunosupresor, y su comparación con los grupos control no tratados. Con ello somos capaces de detectar la densidad de fibras nerviosas regeneradas/unidad de superficie.

C) Estudio electromiográfico mediante estimulación eléctrica capaz de desencadenar contracción del grupo muscular inervado por el nervio operado y su comparación con las fibras no tratadas. Con ello pretendemos confirmar la regeneración de la fibra nerviosa tratada, que adquiere capacidad para transmitir el impulso aplicado haciéndolo evidente mediante la contracción muscular.

El objetivo global del estudio realizado, estructurado en las tres partes comentadas, ha sido demostrar el posible beneficio de la aplicación

clínica del fármaco FK 506 para inducir tanto la regeneración histológica del nervio, al inhibir la reacción de rechazo, como su regeneración fisiológica permitiendo la transmisión del impulso hasta la fibra muscular.

En función de los objetivos planteados, se ha estructurado el trabajo en los siguientes grupos:

Grupo 1A: Trasplante alogénico. Grupo control. 5 semanas.

Grupo 1B: Trasplante alogénico. Grupo control. 11 semanas.

Grupo 2A: Trasplante alogénico. Grupo tratado. 5 semanas.

Grupo 2B: Trasplante alogénico. Grupo tratado. 11 semanas.

Cada grupo consta de 10 animales, lo que supone el trasplante de 20 nervios ciáticos

HIPOTESIS DE TRABAJO

Para plantear la hipótesis de trabajo hemos partido de las siguientes premisas:

A) En una fibra nerviosa lesionada sólo existirá regeneración de la misma si el soma celular permanece intacto. Posteriormente, del extremo proximal seccionado, habrán de nacer nuevas ramas en longitud y diámetro, en dirección al extremo seccionado distal, para crear nuevas conexiones sinápticas restableciendo así la continuidad de la fibra y su funcionalidad.

B) Los defectos nerviosos deberían poder ser reemplazados, de una forma ideal, por segmentos del mismo nervio y mismo emplazamiento que el segmento defectuoso, para garantizar al máximo la recuperación de su funcionalidad. Siendo insuficiente la fuente de material nervioso autólogo en el ser humano, se establece el aloinjerto de nervio como la estructura ideal para reparar lesiones de este tejido.

C) La diferencia de resultados obtenidos entre el trasplante autólogo y alogénico de nervio periférico radica principalmente en el

rechazo inmunológico del injerto, que se produce como consecuencia del reconocimiento de los antígenos de histocompatibilidad del mismo, por el huésped.

Teniendo en cuenta lo anterior, y como hipótesis de base, nos planteamos la posibilidad de que un reciente fármaco de síntesis, denominado FK-506, con propiedades depresoras del sistema inmune, pudiera inhibir la reacción de rechazo responsable de la mayoría de los fracasos de trasplante nervioso alogénico.

En este ámbito, FK-506, ha demostrado ser un potente inmunosupresor de síntesis, de probada eficacia en trasplantes de otros órganos como pulmón, corazón, hígado y riñón, que ha demostrado ser de 10 a 100 veces más potente *in vitro*, que la CyA, e *in vivo*, ha resultado ser 10 veces más potente que la misma droga en inhibir la reacción injerto-contra-huésped, habiéndose aplicado clínicamente en algunos trasplantes de órganos, y aunque no exento de toxicidad y efectos secundarios adversos, que se presentan siempre en relación a la dosis y vía de administración, éste fármaco ha demostrado carecer casi por completo de toxicidad en animales de experimentación al administrarlo a dosis reducidas.

Por tanto y según estas premisas podemos concretar nuestra hipótesis planteando que, siendo FK-506 el mayor fármaco inmunosupresor conocido hasta el momento, y siendo su potencia muy superior a la de otros fármacos actuales y su toxicidad considerablemente menor, al haberse obtenido con ésta droga, resultados notorios en el trasplante de otros órganos, podemos suponer que el resultado puede ser igualmente positivo al aplicarlo como inhibidor de la reacción inmunológica de rechazo en el trasplante de nervio periférico, obteniendo con ello, una adecuada regeneración histológica del mismo y una recuperación de su funcionalidad, lo que podrá ser de utilidad clínica en humanos para solventar lesiones nerviosas de extensión y complejidad importantes.

II.- MATERIAL Y METODOS

A.- MATERIAL

1.- ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Para la realización del estudio se han empleado ratas macho de las cepas Wistar como receptoras, y ratas BN (Brown Norway) como cepa donante. Ambas presentan diferentes marcadores de identidad, para dar cabida a la posibilidad de rechazo postrasplante.

Todos los animales han sido suministrados por Iffa-Credo® y se han mantenido en las condiciones habituales en el animalario del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Universitario San Carlos de Madrid.

Los animales, todos de peso aproximado entre 225-275 g para hacer homogéneos los grupos, fueron observados durante los días previos a la intervención y seleccionados solamente aquellos libres de enfermedades como diarrea, parasitación externa, conjuntivitis, caída de pelo o rinitis. Durante este periodo tuvieron una dieta *ad libitum*.

1.a.- DIETA DE MANTENIMIENTO

Se ha suministrado una dieta de mantenimiento Rata-Ratón Lética® tipo IPM-R20 cuyo análisis químico básico es el siguiente:

- Humedad máxima 9.00%
- Proteína bruta 17.00%
 - Lisina, mínimo 0.70%
 - Metionina+Cisteína, mínimo 0.50%
- Grasa bruta, mínimo 3.00%
- Fibra bruta, máximo 5.00%
- Cenizas, máximo 5.00
- Calcio, mínimo 0.80%
- Fósforo, mínimo 0.655
- Cloruros, mínimo 0.60%
- M.E.L.N. 57%

Todo ello supone una energía metabolizable de 2950 Kcal/Kgr. Los animales han tenido libre disposición de pienso y abundante agua potable a su alcance, administrada en biberones de 250 ml utilizando un separador entre éstos y el pienso.

2.- INSTALACIONES

Se han utilizado las instalaciones del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Universitario San Carlos, así como del Departamento de Biología Celular en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid donde se han realizado las técnicas de perfusión intracardiaca y el estudio inmunológico. La morfometría, se ha llevado a cabo en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Salud Carlos III de Madrid y el estudio electrofisiológico en Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

2.a.- ESTABULARIO Y CONDICIONES DE MANTENIMIENTO

Se han utilizado en todos los casos jaulas individuales de Makrolón®, Policarbonato, Tecniplast tipo 2C, transparentes, con techo de reja metálica que incluye un compartimento donde se coloca la comida y el biberón de agua. Las dimensiones de la jaula son de 260 x 200 mm de medida interna de la cubeta con 120 mm de altura (50 mm de cama con viruta) y area de base de 410 cm². Como cama o lecho se ha empleado viruta para animales de laboratorio Ultrasorb Panlab®, carente de polvo, colorantes, insecticidas, fungicidas y sin productos químicos.

En todos los casos se han observado las directrices europeas relativas a enjaulado de roedores de laboratorio nº 86/109 de la CEE del 2 de Noviembre de 1986, tanto en lo que se refiere a la superficie mínima del suelo de la jaula en relación al peso de la rata, humedad y temperatura de la habitación, **Arias⁸, Vaquero²⁶⁰**.

Los animales se alojaron en una habitación con un periodo de 7 horas de luz y 17 horas de oscuridad para simular al máximo las condiciones de vida habitual de los roedores, animales preferentemente nocturnos. La

temperatura de la habitación se mantuvo constante a 23°C y la humedad relativa al 47%. La habitación disponía de aire acondicionado y se impidió el paso a personas no autorizadas para evitar estrés en los animales.

2.b.- QUIROFANO EXPERIMENTAL

Se dispuso de quirófano para cirugía experimental equipado básicamente con:

- Mesa quirúrgica.
- Lámpara móvil.
- Campana de anestesia de éter para pequeños animales.
- Microscopio quirúrgico.
- Aire acondicionado.
- Máquina rasuradora.

3.- MATERIAL QUIRURGICO

3.a.- INSTRUMENTAL MACROQUIRURGICO

Se ha utilizado material macroquirúrgico, aunque delicado, durante la disección de la piel y músculo hasta llegar al nervio ciático de la rata. El conjunto utilizado se compone de:

- Mango de bisturí metálico de diversos tamaños.
- Hojas de bisturí de diferentes numeraciones.
- Porta-agujas de Mayo.
- Tijera quirúrgica de Mayo recta y curva.
- Tijera de disección curva.
- Pinza de disección de Adson con y sin dientes.
- Pinzas hemostáticas finas tipo "mosquito" (Hartman) curvas.
- Separadores manuales pequeños de Farabeuf.

3.b.- MATERIAL DE MICROCIRUGIA

3.b.1.- MEDIOS DE MAGNIFICACION

Se han utilizado como medios de magnificación quirúrgica:

A) MICROSCOPIO QUIRURGICO:

Se ha empleado para las técnicas de microcirugía nerviosa el microscopio operatorio Carl Zeiss Jena Opm 110, cuyas características son:

- Iluminación: lámpara halógena 6V 20W.
- Margen de inclinación: -15, + 120 grados.
- Distancia de trabajo: 200, 300 y 400 mm.
- Aumentos: 7.5 X.
- Diámetro del campo visual: 22 mm.

B) GAFAS LUPA:

De 3 aumentos, utilizadas para la disección inicial hasta llegar al nervio.

3.b.2.- SUTURAS

Se han utilizado varios tipos de sutura:

- Sutura de Nylon monofilamento de 10-0 con aguja curva CU-1 de cara cortante y doble aguja.
- Sutura de polipropileno tipo Vycril Blue (Ethicon®, Inc.) de 5-0 y 6-0 con aguja curva de cara cortante.
- Sutura de seda trenzada de 3-0 con aguja TB/15 (Marín®, Lorca, España).

3.b.3.- INSTRUMENTAL MICROQUIRURGICO

Se ha utilizado instrumental microquirúrgico de acero inoxidable, de la casa Chifa®, mate para evitar reflejos, compuesto de:

- Porta-agujas de Barraquer recto y curvo sin cierre, con mecanismo de resorte para evitar maniobras bruscas con mango plano.
- Tijeras de Wescott para disección fina (curvas y romas) y para corte (rectas y puntiagudas).
- Pinzas rectas y curvas tipo relojero denominadas pinzas Dumont.
- Clamps vasculares utilizados en nuestro caso para clampaje de la arteria poplítea que hemos disecado a la hora de la extracción del nervio para tener mayor longitud de resección.

4.- FK-506

Para la realización de este trabajo se utilizaron 2 viales de 20 mg del fármaco inmunosupresor FK-506, facilitado por los laboratorios Fujisawa (Osaka, Japón).

FK-506 pertenece al grupo antibiótico de los macrólidos. Su fórmula molecular es $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ y su peso molecular es 822.05, Fig. 8. El fármaco es soluble en metanol, etanol, acetona, etilacetato, cloroformo y dietiléter; moderadamente soluble en hexano y petróleo-éter e insoluble en agua. Así mismo, se mantiene estable en condiciones medioambientales normales, así como en un medio ácido muy diluido y admite ser almacenado bajo condiciones extremas tales como altas temperaturas, humedad ambiental elevada y bajo exposición luminosa de lámparas fluorescentes.

La forma de presentación para su administración i.m. es en viales conteniendo el fármaco en forma de polvo seco de color blanco, cuyas características de identidad son las siguientes:

Producto: FK-506 (20 mg/vial)

Lote N°: 700952K

Fecha de análisis/envasado: 10 de Marzo de 1995

Descripción: Polvo blanco

PH: 6.30

Disolventes: Etanol (0.045%)

Agua: 0.84%

Excipientes: 54 mg/vial

La preparación de la suspensión para su administración i.m. es la siguiente:

Teniendo en cuenta que cada vial contiene 20 mg de FK-506 y 54 mg de excipiente, cada 37mg de la formulación contenida en el vial corresponden a 10 mg de FK-506 que habrá de disolverse en suero salino hasta obtener la concentración deseada. En nuestro trabajo se han utilizado

dos viales de 20 mg de FK-506 que se han diluido en 100cc de suero salino cada uno. La dosis utilizada ha sido de 0.32 mg/kg/día de tratamiento.

Una vez realizada la solución, ésta permanece como suspensión, que ha de almacenarse en refrigerador o congelador y tiene una estabilidad de al menos 2 meses desde su obtención. Para su correcta administración, vía i.m. la solución ha de agitarse enérgicamente antes de utilizarse, y debido a que la suspensión puede producir cierta irritación tisular local durante su administración, es recomendable aplicar el fármaco alternando el lugar de punción durante los días de tratamiento. La formulación utilizada en este estudio sólo admite ser utilizada en animales y nunca en humanos.

5.- ANTISUEROS

Para realizar el estudio inmunohistoquímico se han utilizado antisueros de rata que permiten la detección de las células más representativas implicadas en la reacción de rechazo postrasplante.

Los anticuerpos primarios anti-rata empleados, cuya referencia, antígeno específico que detecta y clon al que pertenece se detallan a continuación, son los siguientes:

<u>Ref.</u>	<u>Antig. específico</u>	<u>Ac monoclonal</u>
MCA 52	CD 5	MRC OX 19
MCA 55 G	CD 4 y macrófagos	W3/25
MCA 48 G	CD 8	MRC OX 8
MCA 274	Macrófagos	MRC OX 41
MCA 94	CMH clase I (RT 1Aa)	F 16-4-4
MCA 50	CMH clase II (Ia)	MRC OX 17

EL anticuerpo secundario utilizado corresponde al PAP de referencia C 100 3K 250.

Todos los productos utilizados han sido obtenidos de los laboratorios Serotec® (Reino Unido) a través de su delegación en España (casa Atom® en Madrid).

6.- MATERIAL COMPLEMENTARIO

6.a.- ANESTESICOS

Inhalatorios: Se han utilizado para la inducción anestésica, éter dietílico que es un líquido incoloro, irritante, volátil, inflamable y explosivo que se descompone por la luz, el aire y el calor, por lo que debe mantenerse en recipiente opaco.

Inyectables: Se utilizaron combinaciones con los siguientes agentes según los casos:

- Anestesia general para la realización del transplante:

- Atropina	1 cc
- Valium 10 mg (Diazepam®)	2 cc
- Ketamina (Ketolar®)	2 cc
- Suero fisiológico al 0.9%	5 cc

La dosis administrada fue de 1-1.5 cc de la mezcla señalada, según el peso de la rata.

- Anestesia utilizada para la realización del estudio electrofisiológico:

- Atropina	1 cc
- Ketamina (Ketolar®)	2 cc
- Suero fisiológico al 0.9%	5 cc

La dosis administrada fue igualmente de 1-1.5 cc en relación al peso del animal.

6.b.- ANTISEPTICOS

Se han utilizado dos tipos de antisépticos habituales en cirugía de diferente composición química, que son la clorhexidina (Hibitane®) y un iodóforo (Betadine®).

6.c.- RASURADORA

Para rasurar a la rata se ha empleado la rasuradora denominada Detachable Blade Small Animal Clipper Oster Golden A 5 modelo 5-55 H, con potencia de 35 Watt y frecuencia de 50 Hz.

6.d.- BASCULA

La báscula utilizada es la denominada Lética® digital, modelo LE-2000.

6.e.- MATERIAL ICONOGRAFICO

Para la fotografía macroscópica se ha utilizado una máquina fotográfica Minolta® Dinax 3000-I, con obturador de velocidad controlada automáticamente de forma electrónica, lentes de aproximación y flash circular.

Para la realización del estudio inmunohistoquímico se ha utilizado un fotomicroscopio Zeiss. Se obtuvieron diapositivas del material histológico observado utilizando una película AGFACHROME RS 100 PLUS profesional (iso 100/21°) y reveladas utilizando el kit de hobby-pac CAT 501 4329 de Kodak.

Para la realización del estudio morfométrico se ha utilizado una cámara color (Hitachi KP-C 503 acoplada a un microscopio Nikon).

6.f.- TALLADORA

Para realizar los cortes semifinos con piramidotomo (1μ) se ha utilizado una talladora T.M. 60 Reichter OM 43.

6.g.- ANALISIS DE IMAGEN

Para realizar el conteo axonal de las fibras nerviosas se ha utilizado un sistema de análisis de imagen con el software MIP 4ADV de C.I.D. España, integrado en un ordenador personal (PC, Pentium), Fig. 10.

7.- SISTEMA DE ELECTROFISIOLOGIA

Para la evaluación de la conducción electrofisiológica se ha utilizado el dispositivo TOF GUARD^{NMT} de la casa Biometer International A/S, Fig. 11.

CARACTERISTICAS DEL MONITOR TOF-GUARD^{NMT}

El monitor de la transmisión neuromuscular TOF-GUARD está compuesto por un estimulador de nervios periféricos y un electromiográfico, con un microprocesador que integra de forma automática los potenciales de acción muscular y los registra en un inscriptor termosensible y en una pantalla digital, Fig. 12. Produce una estimulación automática con trenes de cuatro estímulos de 0.1 ms de duración de duración a una frecuencia de 2 Hz repetidos cada 20 seg, estableciéndose previamente y de forma automática el nivel del estímulos supramáximo (autocalibración). El sistema integra toda el área del potencial de acción muscular comparando de forma continuada las áreas obtenidas con el valor de autocalibración efectuado al comienzo de la estimulación (T1); simultáneamente compara, en cada tren de cuatro estímulos, el área evocada por la primera y cuarta estimulación, expresando los resultados en porcentaje.

Fig. 10. Análisis de imagen morfométrico. Software MIP4ADV' (PC PENTIUM).

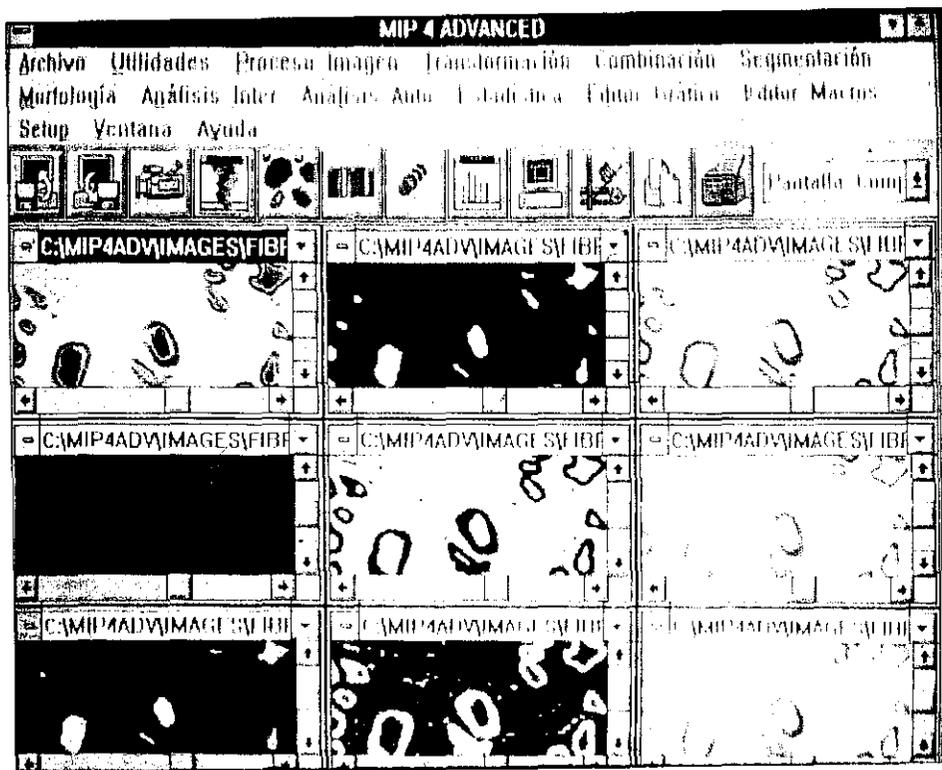
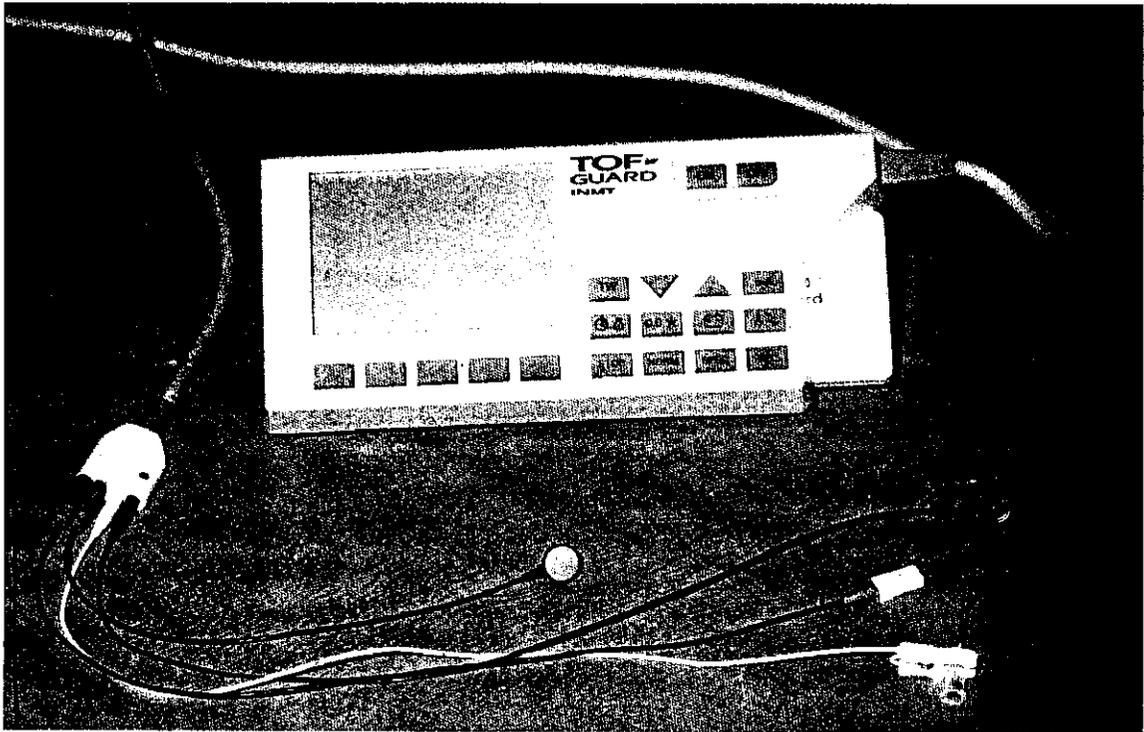


Fig. 11. Sistema de electrofisiología.



$$T1 = \frac{\text{Area de estímulo simple}}{\text{Area control}} \times 100$$

$$TR = \frac{\text{Area última respuesta T4}}{\text{Area primera respuesta T1}} \times 100$$

B.- METODOS

1.- DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL

En el presente estudio se han utilizado ratas Wistar macho adultas de 3 meses de edad y peso aproximado de 250 g. Las ratas fueron sometidas a trasplante alogénico de nervio ciático, procedente de ratas donantes Brown Norway, de edad y peso similares a las receptoras.

Tras el acto quirúrgico, las ratas fueron distribuidas en 8 grupos, estudiándose en cada uno de ellos 20 injertos nerviosos procedentes de las 10 ratas que han constituido cada grupo. Del total, 4 de estos grupos (1A, 2A y 1B, 2B) fueron destinados al estudio inmunohistoquímico, utilizándose el resto de ellos (3A, 4A y 3B, 4B) para el estudio morfométrico o contaje axonal. Todas las ratas fueron a su vez utilizadas para estudiar la conducción nerviosa del injerto, hasta su sacrificio y posterior procesamiento de las muestras en distinta forma, según se realizara sobre ellas uno u otro de los estudios mencionados. La mitad del total de los animales fueron sometidos a tratamiento inmunosupresor con FK 506 a dosis de 0.32 mg/Kg/día vía i.m. diariamente desde el día de la cirugía hasta un total de 5 y 11 semanas. La otra mitad no recibió ningún tratamiento, estableciéndose como grupo control, y sacrificándose en los mismos tiempos. Queda por tanto establecida la estructura del presente estudio como sigue:

Estudio inmunohistoquímico:

Grupo 1A: Alotrasplante control. 5 semanas.

Grupo 2A: Alotrasplante tratado. 5 semanas.

Grupo 1B: Alotrasplante control. 11 semanas.

Grupo 2B: Alotrasplante tratado. 11 semanas.

Estudio morfométrico:

Grupo 3A: Alotrasplante control. 5 semanas.

Grupo 4A: Alotrasplante tratado. 5 semanas.

Grupo 3B: Alotrasplante control. 11 semanas.

Grupo 4B: Alotrasplante tratado. 11 semanas.

Estudio de conducción nerviosa:

Grupos 1A, 2A, 1B, 2B, 3A, 4A, 3B, 4B.

2.- TECNICA QUIRURGICA

2.a.- ANESTESIA

Inicialmente se utilizó como anestésico general por vía inhalatoria, la aplicación de una atmósfera de éter por medio de algodones empapados contenidos dentro de una campana transparente para anestesia de pequeños animales, hasta que éstos quedan totalmente dormidos. Previamente a esta circunstancia se suele observar en el animal fases de agitación

2.b.- COLOCACION DEL ANIMAL

Cuando la rata se encuentra anestesiada se procede a su colocación sobre la mesa quirúrgica donde se ha dispuesto una plancha de corcho a la que se fija la rata con esparadrapo en posición lateral con las extremidades dorsales en semiflexión y adducción, postura en la que el nervio ciático se encuentra sin tensión y fácilmente accesible.

2.c.- ASEPSIA

Para establecer unas condiciones de asepsia mínimas del campo quirúrgico se procede a su rasurado que se realiza en seco en la región dorsal del miembro inferior, desde la línea media hasta más abajo de la articulación de la rodilla. Cranealmente, el límite se establece en la cresta ilíaca del mismo lado. A continuación se procede a la limpieza de la zona

con un vaporizador de Clorhexidrina, Hibitane®. Por último se aseptica el campo rasurado con Betadine®.

2.d.-TECNICA QUIRURGICA

Se incide la piel con bisturí en la parte dorsal del miembro inferior en una línea que siga una dirección desde medio centímetro anterior de la raíz de la cola hasta la articulación fémorotibial. Se disecciona la piel y tejido celular subcutáneo hasta llegar a la aponeurosis a nivel de la musculatura, sobre la que se aborda en la unión entre los músculos abductor cruris craneal y biceps femoral, sin seccionar ninguno de ellos limitándose a separarlos y colocar separadores confeccionados con clips sujetapapeles. Conviene evitar la confusión con la unión entre el bíceps y semitendinoso, punto por el que también es posible llegar al nervio pero con un abordaje más dificultoso y sangrante al existir mayor cantidad de vasos en esta región. De esta manera se alcanza el nervio ciático. Hasta aquí la técnica quirúrgica se ha realizado con gafas lupa de 3 aumentos. A partir de este momento se utilizará el microscopio quirúrgico para conseguir una disección lo más precisa y menos traumática posible.

El nervio ciático se expone desde su salida por debajo del músculo piramidal hasta un nivel lo más distal posible y que debe visualizar siempre la bifurcación en tibial y peroneal. En esta fase aún no hemos actuado sobre el nervio directamente. Se procede ahora a la disección roma del nervio ciático separándolo de las estructuras circundantes a las que se une por un tejido conjuntivo laxo, hasta que este queda totalmente liberado y expuesto como se muestra en la Fig. 13. A continuación se procede a la extracción del nervio, para lo cual se realizan dos cortes limpios para evitar la aparición de cabos insatisfechos, exactamente bajo el músculo piramidal y en el extremo opuesto antes de su bifurcación.

La interposición del aloinjerto nervioso se realiza mediante la extracción de un fragmento de nervio ciático de aproximadamente 10-15 mm de una rata de la cepa BN (Brown Norway) siguiendo los mismos pasos comentados anteriormente para su disección, Fig. 14. Una vez obtenido el injerto, éste se mantiene en suero fisiológico y se procede a la disección del nervio ciático de la rata receptora de la cepa Wistar y posterior excisión de un fragmento de unos 4-5 mm donde se interpondrá el injerto. Se sutura

Fig. 13. Nervio ciático de rata donante.



Fig. 14. Técnica quirúrgica del aloinjerto nervioso (fragmento donante).



ahora el cabo distal del injerto con el cabo distal del nervio receptor con técnica de puntos epi-perineurales y de igual manera los cabos proximales evitando en todo momento que exista tensión en las zonas de unión, Fig. 15.

Una vez realizada la anastomosis procedemos al cierre por planos uniendo los grupos musculares antes separados, mediante suturas reabsorbibles de Vycril® de 5-0. Posteriormente se cierra la piel mediante sutura continua de seda de 3-0, se aplica clorhexidina líquida (Hibitane®) sobre la sutura y tejidos cutáneos circundantes y se deposita el animal en una jaula con cama limpia hasta su despertar completo.

3.- ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DEL NERVI CIÁTICO

Para una investigación científico-clínica rigurosa y exigente será preciso recurrir a estimuladores complejos y sofisticados, con ondas cuadradas o rectangulares, con la posibilidad de variar la frecuencia de los estímulos desde 0.01 á 1.000 Hz con posibilidad de regular el voltaje desde 15 mV hasta 350 mV.

Tipo de electrodos.- Se utilizaron agujas subcutáneas, teniendo cuidado de dejar las puntas de las agujas próximas, pero no dentro, del nervio; procurando también que las puntas de las agujas estén separadas la una de la otra por lo menos una distancia de 1 cm. Tanto las agujas como los hilos eléctricos deberán ser fijados a la piel con adhesivos y orientados en el sentido del eje longitudinal del nervio, Fig. 16.

Polaridad de los electrodos.- El electrodo negativo se coloca sobre la parte distal del nervio y el electrodo positivo sobre la porción proximal.

Intensidad de los estímulos.- Los estímulos son supramáximos. El estimulador es regulable, procediendo de la siguiente manera: Se colocan los electrodos sobre la línea del nervio ciático. Se escoge la frecuencia de 0.1 Hz (estimulación simple = un estímulo cada 10 sg). Se conecta el estimulador manteniendo el nivel de intensidad en el valor más bajo y se observa si hay o no respuesta mecánica a nivel de la extremidad. Se aumenta gradualmente la intensidad de la estimulación, de división en división, hasta que se obtienen respuestas visibles en la extremidad. Una vez

Fig. 15. Técnica quirúrgica del aloinjerto nervioso (aloinjerto anastomosado a nervio ciático receptor).

Fig. 16. Detalle del estudio de conducción del nervio ciático.



obtenidas estas respuestas, se coloca el indicador de intensidad de 0.5 a 1 unidad por encima de aquella que desencadenó las primeras respuestas visibles de la extremidad. Esta intensidad es la llamada "supramáxima" o "supralaminar".

Frecuencia de los estímulos.-

- 0.1 Hz estimulación simple o twitch: Interesa, sobre todo, cuando lo que se estudia es el "análisis de tiempos". La amplitud de las respuestas mecánicas a la frecuencia de 0.1 Hz es la amplitud de referencia para los tests o para el estudio que utilizan otras frecuencias. Los tiempos pueden ser repetidos en valores absolutos o bien ser anotados en valores correlativos.

- 2 Hz tren de cuatro o "train of four": La frecuencia de 2 Hz es una frecuencia antifisiológica que produce un agotamiento de la liberación de acetilcolina sin acelerar ni la recaptación de colina, ni la resíntesis de acetilcolina, ni la movilización de la acetilcolina de reserva. De aquí que una serie de cuatro estímulos con una frecuencia de 2 Hz acabe produciendo un agotamiento más o menos pronunciado de las tres últimas respuestas. Un punto de máxima importancia cuando se utiliza la monitorización con salvas de cuatro estímulos es el intervalo de tiempo que debe de existir entre las diferentes salvas que deben ser, como mínimo, iguales o superiores, a los 10 segundos (tiempo mínimo necesario para que se rehaga la carga de acetilcolina inmediatamente disponible). En otras palabras, la repetición de salvas de cuatro estímulos con intervalos de tiempo inferiores a los 10 segundos acabará por producir un agotamiento de acetilcolina que nos llevará a un falso diagnóstico. En términos prácticos, la primera respuesta de un tren de cuatro estímulos tiene una amplitud perfectamente idéntica a la respuesta a una estimulación simple (0.1 Hz). La amplitud de la primera respuesta de un tren de cuatro se correlaciona esencialmente por el número de receptores postsinápticos ocupados (bloqueados). Pero las tres últimas respuestas, particularmente la cuarta, presentan un agotamiento, una disminución de amplitud en relación a la primera respuesta.

30-200 Hz o estimulación tetánica: Las frecuencia superiores a 30 Hz producen respuestas más amplias de las que se originan con la frecuencia de 0.1 Hz (por causar una mayor liberación de acetilcolina y consecuentemente por estimular un mayor número de receptores postsinápticos. La valoración de la tensión-desplazamiento producida por la estimulación tetánica debe ser hecha durante 5 segundos

4.- SACRIFICIO DE LOS ANIMALES Y OBTENCION DE MUESTRAS

Los animales han sido sacrificados en dos tiempos, a las 5 y a las 11 semanas desde la realización del alotrasplante nervioso. Dentro de estos tiempos a su vez, se ha diferenciado un grupo de animales tratados con inmunosupresor y otro grupo control que no recibió tratamiento. Por otro lado, la mitad del total de los animales, se destinaron a un estudio inmunohistoquímico y el resto a un estudio morfométrico, siendo en cada caso diferente la técnica de sacrificio y extracción de muestras, así como su posterior procesamiento.

4.a.- GRUPO DE ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NERVI CIÁTICO

Las ratas fueron anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de Equitesín® (Jansen Lab.) a dosis de 60 mg/kg. A continuación se procedió a la toracotomía de los animales para descubrir el corazón. Con el fin de evitar la coagulación sanguínea se inyectó intaventricularmente 1 ml de heparina sódica (1% p/v).

Posteriormente se realizó una incisión en la cavidad ventricular izquierda a través de la cual se introdujo una cánula hasta la embocadura de la arteria aorta (perfusión vía aorta ascendente). A continuación se procedió durante unos minutos, al lavado con suero salino (CINa 9%) del sistema cardiovascular para eliminar los elementos sanguíneos tras seccionar la aurícula derecha y facilitar así la posterior circulación del líquido fijador, evitando siempre la interrupción en el flujo de perfusión. Tras el lavado vascular y vía aorta ascendente, se procedió a dar paso 500 ml de una solución fijadora, durante 40 minutos aproximadamente. La mezcla aldehídica fijadora estaba compuesta por 4% (p/v) de paraformaldehído, 0.1% de glutaraldehído en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4), Karnowsky¹²⁷, con el fin de compatibilizar una óptima preservación morfológica con la conservación de las propiedades antigénicas, químicas y/o funcionales de las moléculas a detectar.

Posteriormente se procedió a la rápida, pero cuidadosa extracción de los nervios ciáticos operados, identificando y separando las porciones proximal, distal y medial de la operación quirúrgica, realizándose en un segundo tiempo una postfijación de las muestras durante 4 h a 4°C, para evitar la retracción celular, en una solución de paraformaldehído (4% p/v) en tampón fosfato 0.1M (pH= 7.4).

4.b.- ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL NERVIO CIÁTICO

Los animales, como en el grupo anterior, fueron anestesiados con 60 mg/kg de Equitesín® (Jansen Lab.) intraperitonealmente. A continuación se procedió a la toracotomía de los animales. Se inyectó 1 ml de heparina sódica (1% p/v), para evitar la coagulación sanguínea. Posteriormente se procedió al lavado con suero salino (ClNa 9%) por vía intracardiaca y, sin permitir interrupción en el flujo de perfusión, se introdujo vía aorta ascendente, 500 ml de una solución fijadora, durante 40 minutos aproximadamente. La mezcla aldehídica fijadora estaba compuesta por glutaraldehído 1% (v/v) en tampón Karnovsky (pH=7.4), **Karnovsky¹²⁷**.

La solución Karnovsky consta de:

solución A: Tampón cacodilato 0.2M.

solución B: paraformaldehído 10 % (p/v).

Tras la fijación se procedió a la rápida, pero cuidadosa extracción de los nervios ciáticos operados, identificando y separando las porciones proximal, distal y media de la operación quirúrgica.

5.- PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE NERVIO CIATICO

5.a.- ESTUDIO HISTOLÓGICO A MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL

Una vez extraídos los nervios operados de ambos grupos, como se ha descrito, parte de las muestras fueron procesadas para poder ser visualizadas a microscopio óptico. Para ello, tras la fijación y extracción de los nervios, éstos se volvieron a fijar en la misma solución durante 4h a 4°C. Tras el

lavado de las muestras histológicas en tampón fosfato (0.1M, pH=7.5), éstas fueron crioprotegidas en una solución tamponada (tampón fosfato 0.1M, pH=7.5) de sacarosa 2.3M durante 12 horas a 4°C. Tras la crioprotección las muestras fueron seccionadas, utilizando un microtomo de congelación. Los cortes de 10-20 μ m fueron montados sobre portaobjetos previamente tratados con gelatina/cromalumbre, teñidos con hematoxilina-eosina y azul alcian-hemalumbre-picrocarmín de índigo. Los cortes fueron deshidratados en una serie alcohólica creciente, aclarados con xileno y montados con DePeX.

5.b.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NERVI CIÁTICO

Una vez extraídas las muestras, se procedió al lavado de las mismas en tampón fosfato (0.1M, pH=7.4), durante 2h, tras lo cual se procedió a la crioprotección de los tejidos utilizando una solución 2.3 M de sacarosa en tampón fosfato 0.1M (pH=7.4) durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente las muestras fueron incluidas en gelatina, para la confección de los bloques que contenían las muestras:

Sacarosa 15% (p/v).

Gelatina 15% (p/v).

Tampón fosfato 0.1M (pH= 7.5).

A continuación se procedió a la fijación de los bloques de gelatina en una mezcla de formaldehído al 3.5% (v/v) y sacarosa 30% (p/v) en tampón fosfato 0.1M (pH=7.5), durante 5h a 4°C. Tras la fijación de los bloques, se procedió a la obtención de cortes de 30-40 μ m mediante microtomía de congelación. Los cortes fueron lavados repetidas veces en PBS 0.1M (pH=7.5) (Tampón fosfato salino) y tratados con una solución de H₂O₂ al 0.3% (v/v) en PBS (0.1M, pH=7.5), durante 30 minutos, para llevar a cabo la inhibición de la peroxidasa endógena. Tras repetidos lavados en PBS (0.1M, pH=7.5), los cortes histológicos fueron tratados con una solución al 1% (p/v) de NaBH₄ (Sigma Chem. Co.) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, con la finalidad de revertir en parte la fijación y restablecer con ello la antigenicidad, **Baschong**¹².

Los cortes se lavaron repetidas veces en PBS, y posteriormente se trataron con una solución centrifugada a 3000 g durante 15 minutos de 0.5M de L-lisina en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, o glutamina 0.5M en PBS con la finalidad de bloquear los grupos aldehídos libres.

A continuación se procedió a la detección inmunohistoquímica de los diversos antígenos, mediante inmunomarcaje indirecto, siguiendo el método inmunohistoquímico del PAP, **Sternberger**^{231,232}.

Los cortes fueron incubados con los siguientes antisueros específicos, incubando primero 2h a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche en nevera a 4°C, manteniendo siempre los medios de incubación en continua agitación. Los antisueros específicos utilizados (Serotec®) fueron diluidos en PBS utilizando las diluciones que se especifican a continuación:

Antisuero antirata MRC OX-19 (Anticélulas T): Dilución 1:50; W3/25 (Anticélulas T helper y macrófagos): Dilución 1:50; OX-8 (Anticélulas T citotóxicas): Dilución 1:50; OX-41 (Antimacrófagos, granulocitos y células dendríticas): Dilución 1:100; F 16-4-4 (Anti CMH clase I de rata, equivalente a Ag RT 1Aa de rata): Dilución 1:50; MRC OX-17 (Anti CMH Clase II de rata, equivalente a cadena alfa del Ag Ia de rata, homólogo del Ag Ia-E de ratón): Dilución 1:100.

Tras repetidos lavados en PBS, los cortes se incubaron en el anti-mouse IgG, desarrollado en cabra y diluido 1:500 en PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los cortes repetidamente en PBS y se incubaron en el complejo PAP-mouse (1:500) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y agitando de forma permanente el medio de incubación. Los cortes se lavaron 3 veces en PBS y se incubaron en la solución cromógena de 0.5 mg/ml de hidrocloreuro de 3,3' -diaminobenzidina (DAB) durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación se procedió al revelado de la reacción utilizando una solución de 0.5 mg/ml de DAB y H₂O₂ (0.01%, v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar los cortes con PBS, estos fueron montados sobre portaobjetos previamente gelatinizados con una mezcla de gelatina/cromalumbre, con la finalidad de adherir los cortes a los portaobjetos, deshidratados en una serie alcohólica creciente y montados con DePeX.

La técnica de la metenamina de plata, **Gallyas**⁷⁹, fué utilizada con el fin de intensificar la reacción de algunos de los cortes seleccionados previamente. Para ello, se incubaron los cortes en una solución de metenamina de plata durante 10 minutos en estufa a 56°C. Tras tres lavados de cinco minutos en H₂O destilada se trataron con una solución al 0.2% (p/v) de AgCl₂ en H₂O destilada durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente los cortes en agua destilada, se trataron con tiosulfato sódico al 2.5% (p/v) en H₂O destilada durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el material fue lavado con H₂O destilada, deshidratado en una serie de alcoholes en gradación creciente y montándolos utilizando un medio permanente (DePeX).

CONTROLES DE ESPECIFICIDAD:

- DE LOS ANTISUEROS: Los antisueros utilizados en este estudio experimental han sido adquiridos a través de la casa comercial Serotec®. Los protocolos de especificidad han sido publicados previamente, determinándose que las posibles reacciones cruzadas, determinadas mediante técnicas de ELISA y RIA, son consideradas nulas o cercanas a niveles no detectables.

a.- Antisuero conteniendo Ac monoclonales MRC OX-19, contra timocitos y células T de rata (CD5). Estos Ac reconocen como antígeno una glicoproteína de los timocitos, un determinante expresado en la superficie de todos los timocitos y células T periféricas. Este anticuerpo resulta útil en la identificación de las células T ya que, a diferencia de lo que ocurre con otros marcadores de células T de rata, parece específico para esta estirpe celular **Dallman**^{40,41}, **Barclay**¹⁰. No reconoce ni macrófagos, ni células NK (Natural Killer) ni mastocitos ni otros tipos celulares, **Dallman**⁴¹. El antígeno reconocido específicamente por este antisuero es una glicoproteína de 69.000 D de peso molecular y parece ser homóloga a Ly-1 de ratón y al CD5 humano.

Utilizamos una dilución 1:50 puesto que se comprobó que era la que mejores resultados ofrecía sin tinción inespecífica de fondo.

b.- Antisuero conteniendo Ac monoclonales F 16-4-4 contra Ag RT 1Aa de rata: Estos Ac reconocen como antígeno al CMH de rata

parcialmente purificado. El anticuerpo reacciona con la cadena Mr de 45.000 D del antígeno de la clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), **Hart y Fabe**⁹⁷. Reacciona con todas las cadenas testadas, pero más débilmente con la cadena RT1c, **Hart y Fabe**⁹⁸. Hasta el momento actual ha sido utilizado para determinar inmunohistoquímicamente los antígenos de clase 1 del CMH.

Utilizamos una dilución 1:50 puesto que se comprobó que era la que mejores resultados ofrecía sin tinción inespecífica de fondo.

c.- Antisuero conteniendo Ac monoclonales OX-8 contra linfocitos T citotóxicos (CD8): Estos Ac (Ig G) reconocen un determinante sobre la mayoría de los timocitos (90-95%), una subpoblación de las células T periféricas, la mayor parte de las NK y los leucocitos granulares intraepiteliales. **Brideau**²²; **Dallman**⁴⁰; **Cantrell**³⁰; **Lyscom y Brueton**¹⁵⁴. El antígeno reconocido es un complejo de glicoproteínas de superficie de 34.000, 39.000 y 76.000 D de peso molecular y resulta homólogo al antígeno CD8 humano y al antígeno de ratón Ly-2. El anticuerpo se une a una subpoblación de células T que median la supresión de la formación de anticuerpos, **Brideau**²² y el precursor de células citotóxicas, **Dallman**⁴⁰.

Utilizamos una dilución 1:50 puesto que se comprobó que era la que mejores resultados ofrecía sin tinción inespecífica de fondo.

d.- Antisuero conteniendo AC Monoclonales W3/25 contra linfocitos T helper (CD4): Estos Ac (Ig G) reconocen un determinante presente en la mayor parte de los timocitos (90-95%), población de células T periféricas y macrófagos, **Williams**²⁷⁰; **Brideau**²²; **Barclay**¹⁰. El anticuerpo se une a la población de T-helper, células que median la actividad de las células T y B.

Utilizamos una dilución 1:50 puesto que se comprobó que era la que mejores resultados ofrecía sin tinción inespecífica de fondo.

e.- Antisuero conteniendo Ac monoclonales MRC OX 41 contra macrófagos, granulocitos y células dendríticas: Estos Ac reconocen específicamente a la mayoría de los macrófagos, incluyendo los residentes en el peritoneo, los alveolares y los macrófagos activados. Además detecta

granulocitos y una población de células dendríticas. El antígeno reconocido en los macrófagos es un polipéptido de 110-120.000 D, **Robinson**²⁰⁷.

Utilizamos una dilución 1:100 puesto que se comprobó que era la que mejores resultados ofrecía sin tinción inespecífica de fondo.

f.- Antisuero conteniendo Ac MRC OX 17 contra cadena alfa del Ag Ia de rata: Este Ac, hecho en ratón contra un determinante de la cadena alfa de la Ia de rata (homólogo a la IaE de ratón), reconoce un determinante monomórfico de la IaE de ratón, **Fukumoto**⁸⁴ y se utiliza para determinar inmunohistoquímicamente los Ag de clase II del CMH.

Utilizamos una dilución 1:100 puesto que se comprobó que era la que mejores resultados ofrecía sin tinción inespecífica de fondo.

- DE LA REACCION INMUNOHISTOQUIMICA: En todas las reacciones inmunohistoquímicas realizadas, se llevaron a cabo de forma paralela los siguientes controles:

- a.- Substitución del antisuero específico por suero normal de ratón.
- b.- Omisión del antisuero específico.

5.c.- ESTUDIO MORFOMÉTRICO DEL NERVIO CIÁTICO

Una vez realizada la extracción de las muestras, éstas fueron divididas en dos grupos, identificados como I y II. En el primero de ellos, las muestras se sometieron a una postfijación durante 4 h a 4°C, para evitar la retracción celular, en una solución de paraformaldehído (4% p/v) en tampón fosfato 0.1M (pH= 7.4). El segundo de ellos, por el contrario, se sometió a la postfijación en la misma solución durante un período de 12 horas.

A continuación las muestras se trataron con OsO₄ al 2% en tampón durante 12-24 h a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió al lavado de las muestras en tampón fosfato (0.1M, pH=7.4), durante 2h, en nevera a 4°C. A continuación las muestras fueron deshidratadas en una serie alcohólica creciente, conteniendo el alcohol de 70° acetato de uranilo al

1% (p/v), solución en la que permaneció durante toda la noche en la nevera a 4°C. Al día siguiente se continuó la deshidratación, y previo lavado de las muestras en óxido de propileno, las muestras fueron incluidas en Araldita (Fluka Chemie A.G.). Tras la confección de los bloques, se procedió a la polimerización de la resina epoxi en estufa a 56°C durante 3 días.

Las piezas fueron talladas utilizando una talladora TM 60 Reichert OM U3; los cortes semifinos obtenidos con el piramidotomo (1 m μ) se fijaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con soluciones de azul de Toluidina y parafenildiamina, que tienen la siguiente composición:

Solución de Azul de Toluidina:

1g de Azur II.
1 g de Tetraborato sódico (Borax).
1 g de azul de metileno.
1 ml de glicerina al 30 %.
H₂O d hasta completar 100 ml.

Solución de parafenilendiamina:

1% (p/v) parafenilendiamina.
100 ml metanol.

La tinción de los cortes con azul de toluidina se realiza en caliente, mientras que la de parafenilendiamina se lleva a cabo en frío durante unos 15 minutos. Los cortes son lavados en metanol, y son secados al aire. La parafenilendiamina tiene avidez por depositarse en las estructuras teñidas con osmio.

Finalmente los cortes se deshidrataron y se montaron utilizando un medio permanente como el DePeX.

Una vez procesadas las muestras como se ha descrito se procedió al conteo axonal de las mismas. Para ello se ha utilizado un sistema de análisis de imagen con el software MIP4ADV de C.I.D. España integrado en un ordenador personal (PC , Pentium).

Como paso previo a la medida se calibró todo el sistema para permitir la valoración en micras.

Se captaron imágenes en color real con una cámara color (Hitachi KP-C503) acoplada a un microscopio Nikon a partir de secciones de nervio ciático de ratas de distintos grupos teñidas con parafenildiamina y visualizadas con el objetivo 40x, Fig. 17.

Una vez digitalizadas, las imágenes se transformaron en monocromas según la componente verde, Fig. 18 y se aplicaron las siguientes funciones:

- Realce de contornos, que ofrece como resultado un reenfoque de la imagen delimitando estructuras, Fig. 19.

- Segmentación por niveles de gris, para extraer de la imagen las fibras nerviosas, Fig. 20.

- Positivado, que genera una imagen inversa, Fig. 21, lo que nos permitirá posteriormente aislar los axones.

- Eliminación de objetos, para suprimir el fondo de la imagen junto con las vainas de mielina y conservar únicamente los axones, Fig. 22. Identificación y contaje de objetos, que reconoce y cuenta de forma automática los axones, reflejando el número total, Fig. 23.

El número de axones es equivalente al número de fibras nerviosas, Fig. 24. No se valoraron éstas directamente ante la imposibilidad de segmentarlas de forma individual por el contacto íntimo entre la mayoría de ellas.

Con todas las funciones descritas se elaboró un "macro" o conjunto de funciones preprogramadas. Para cada sección se realizó la primera vez de forma interactiva para fijar las condiciones de luminosidad y contraste, así como para establecer los umbrales de segmentación. Se procedió también a crear ficheros independientes para cada una de las muestras, para el posterior tratamiento estadístico de los resultados.

Se valoró un mínimo de 100.000 μ cuadradas de nervio ciático por sección, mediante el estudio de sucesivas imágenes.

Fig. 17. Imagen digitalizada en color real de sección de nervio ciático.
(Tinción parafeñilendiamina, X40).

Fig. 18. Imagen monocroma (blanco y negro) obtenida a partir del
componente verde de la imagen en color real.

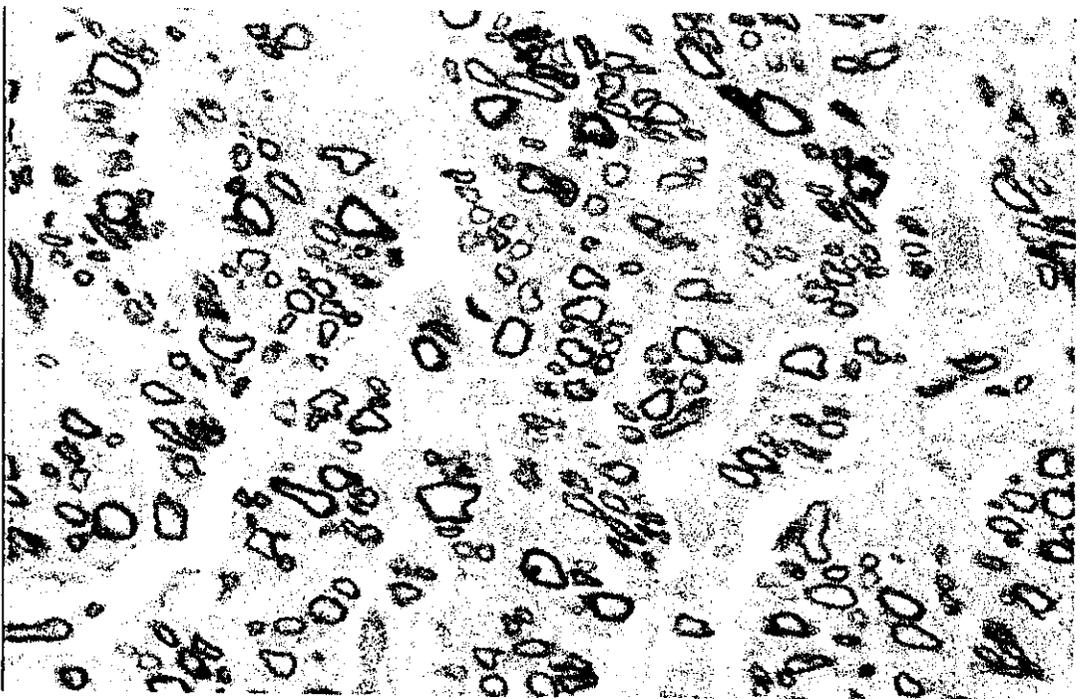
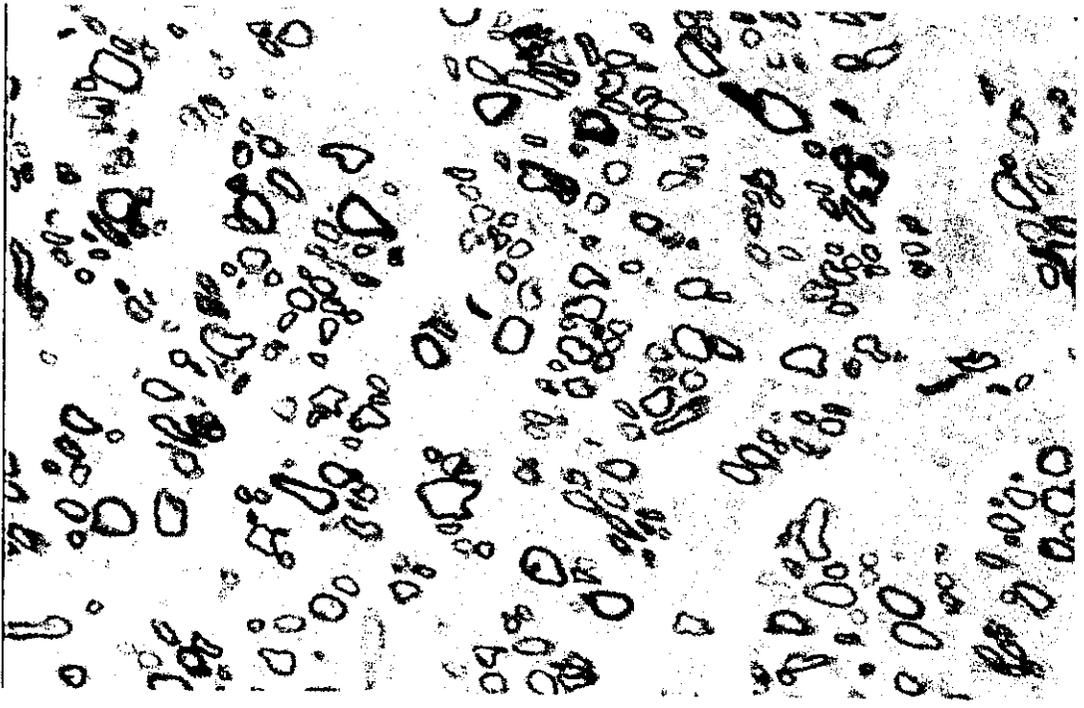


Fig. 19. Imagen obtenida tras aplicar un filtro de realce de contornos a la figura 18.

Fig. 20. Imagen binarizada obtenida mediante segmentación de la figura 19. Los umbrales de nivel gris empleados permiten extraer las fibras mielínicas de resto de las estructuras.

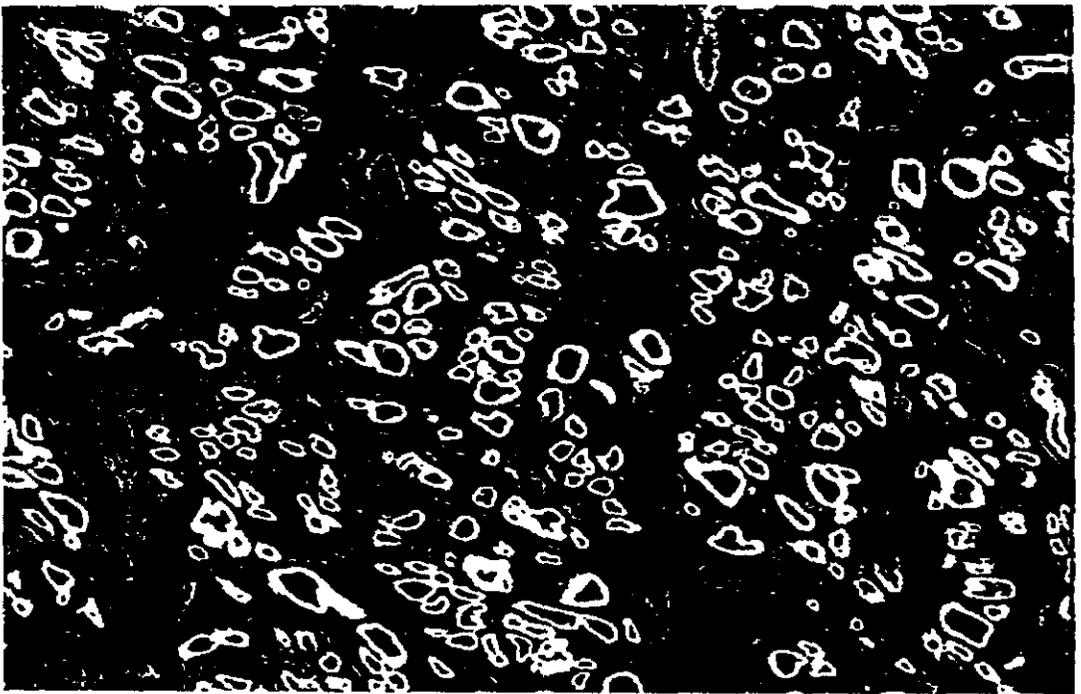
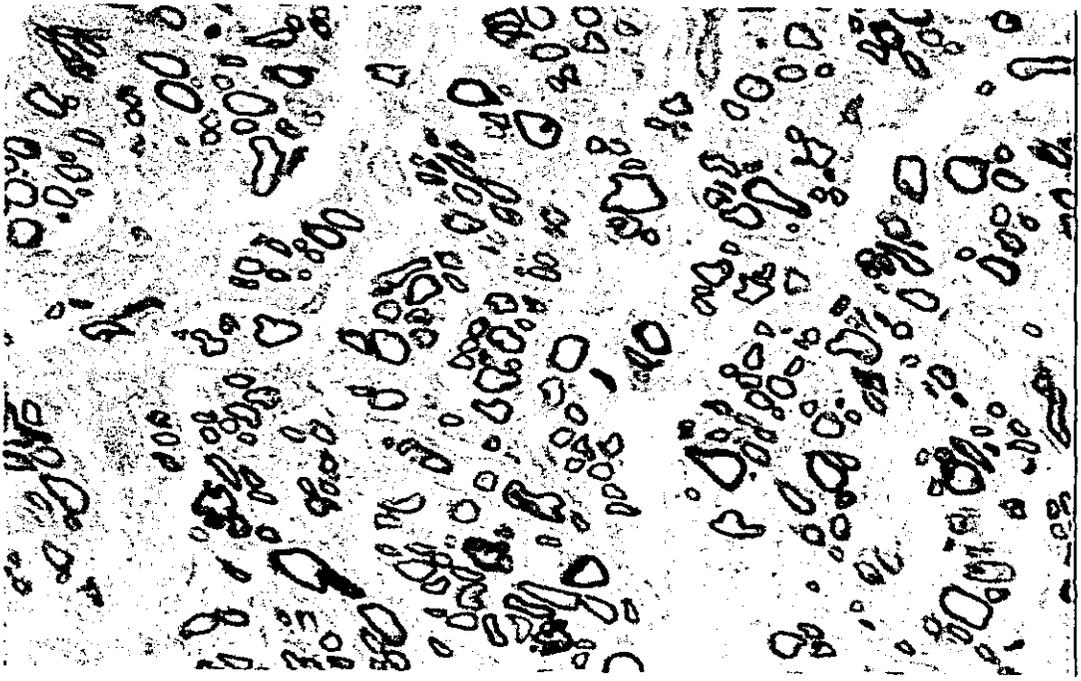


Fig. 21. Imagen inversa de la figura 20 obtenida mediante aplicación de un filtro positivado.

Fig. 22. Imagen obtenida a partir de la figura 21 tras quitar el fondo mediante un filtro de eliminación de objetos. Esta función permite aislar los axones de las fibras nerviosa para su posterior contaje.

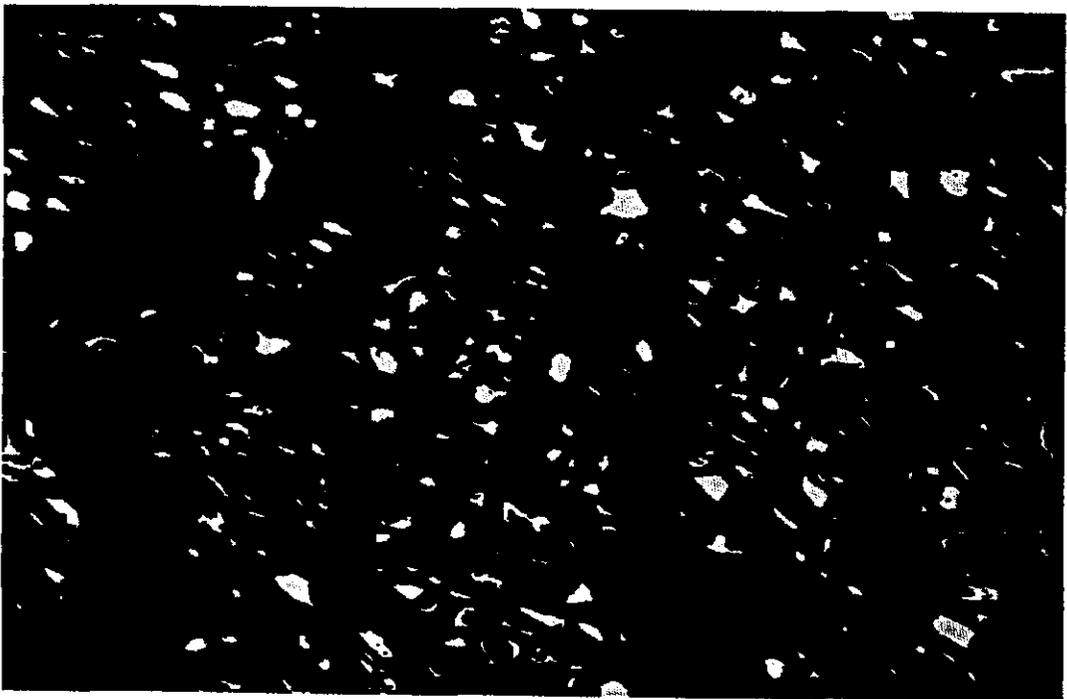
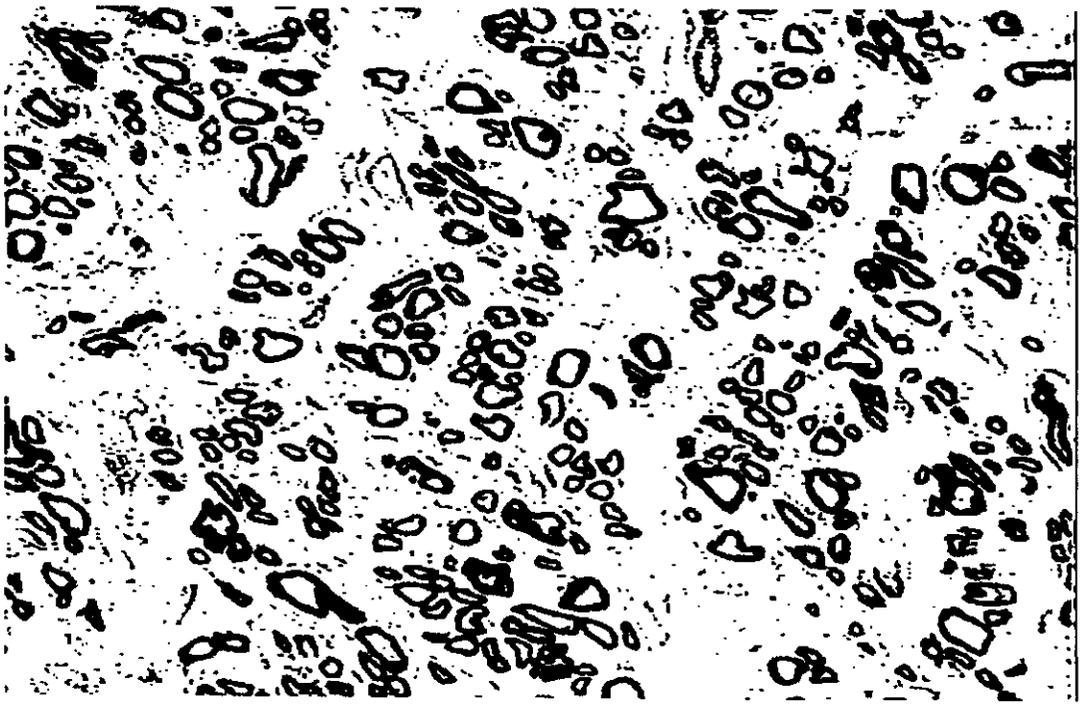
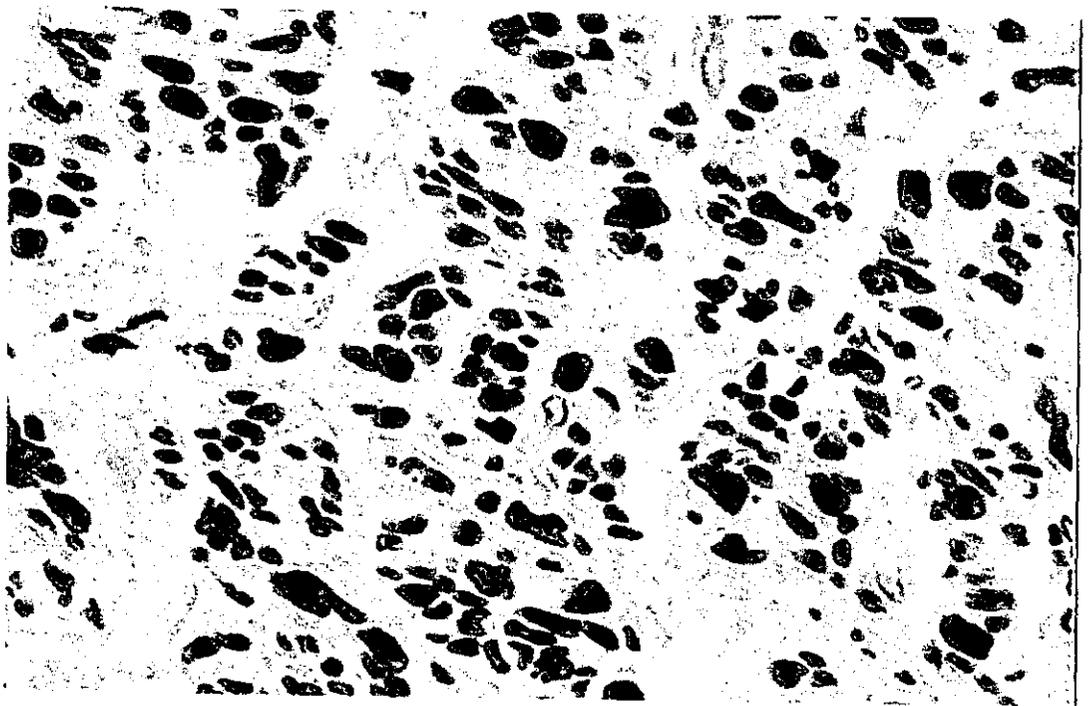
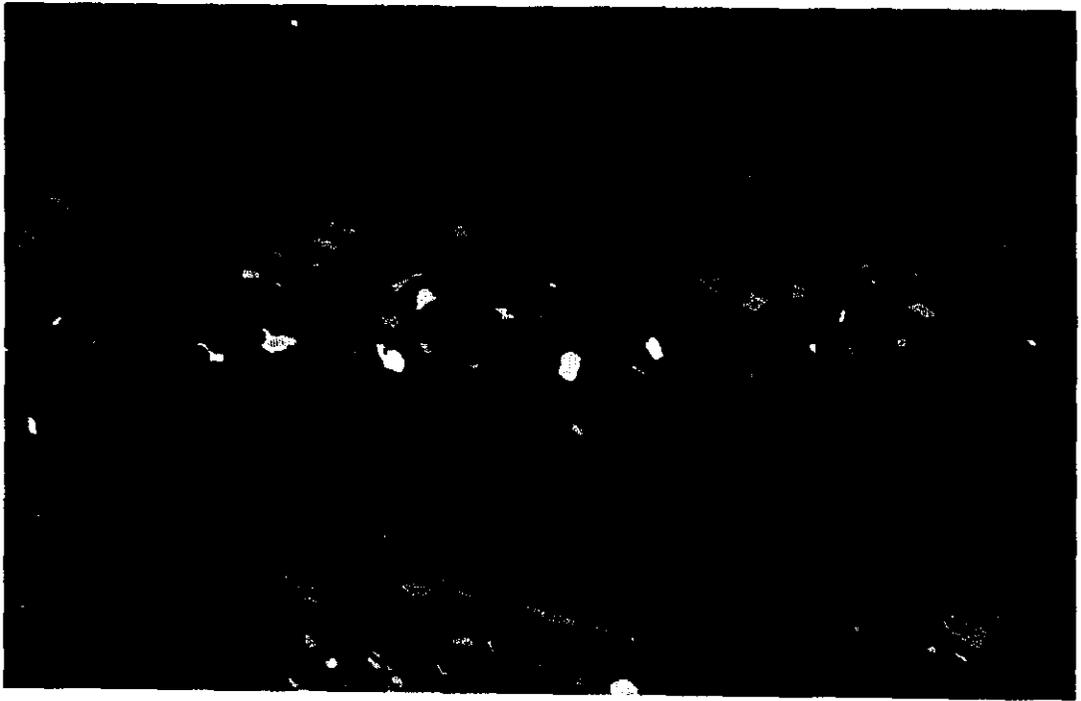


Fig. 23. Identificación y contaje de las estructuras segmentadas en la figura 22.

Fig. 24. Imagen obtenida superponiendo un gráfico que representa las estructuras segmentadas en la figura 22, sobre la imagen monocroma de la figura 18. Se comprueba que las estructuras contadas coinciden con las fibras nerviosas.



El proceso de análisis de imagen se completó con el cálculo del número de fibras nerviosas por 100 μ cuadradas de nervio ciático.

6.- TRATAMIENTO ESTADISTICO

El método científico estadístico hace posible el valorar y medir aquello que aparentemente no tiene medida, la variabilidad biológica, ya que no basta con la descripción cualitativa de unas observaciones.

En Medicina como en cualquier otra rama de la Ciencia no se concibe que se puedan llevar a cabo investigaciones cuyos resultados no puedan ser expresados en forma numérica, precisándose datos concretos. No obstante, infinidad de veces las variables que se tienen que analizar en la práctica de la investigación son esencialmente de tipo cualitativo. El test más comúnmente utilizado para este tipo de análisis es el test de Chi-Cuadrado.

En algunos casos las variables cualitativas presentan una especie de ordenación, variables ordinales, que permiten el poder asignarle una serie de valores cuantitativos arbitrarios. El investigador siempre tiende hacia este tipo de ordenación ya que es sabido que los métodos estadísticos de valoración cuantitativa son más fiables que los que se basan en una ordenación cualitativa.

El investigador, analizando su investigación, desarrollaría de modo numérico su criterio cualitativo clasificatorio. El método es válido en general, aunque presenta cierta arbitrariedad en cuanto a la asignación de los valores. La experiencia indica, sin embargo, que pequeñas diferencias entre diferentes sistemas de clasificación, rara vez dan lugar a conclusiones dispares. Creemos que queda bastante justificada la validez de la transformación en datos numéricos de las observaciones en nuestra serie experimental.

El siguiente paso es encontrar el estadístico de contraste que nos proporcione una mayor información en el análisis de nuestros resultados. En este estudio se ha optado tras un análisis preliminar de los resultados, por un test no-paramétrico (Test de Mann-Whitney). Este tipo de test, al no depender de la distribución de la variable, no precisa la condición previa de normalidad de las poblaciones, a diferencia de los tests paramétricos, como la t de Student que si exigen para su aplicación una distribución normal de la población. Como en nuestros datos numéricos la variable es de tipo discreto (ya que sólo puede tener valores de 1, 2, 3, 4...) no es posible siempre el poder efectuar una aproximación a la normal, ni aún tras una transformación logarítmica. No obstante, en aquellos casos que sobre nuestros datos no se pudo aplicar este tipo de test, se realizó el test de Chi-Cuadrado con corrección de Yates.

Por otra parte, dado que el número de casos analizados en cada grupo es menor de 30, se cumple otro requisito fundamental para la aplicación de estos tipos de tests y es que la población a analizar no sea muy grande.

III.-RESULTADOS

1.- Resultados del estudio a microscopía óptica convencional

A este nivel de microscopía de luz no se observan grandes diferencias entre las muestras pertenecientes a los animales control (operados y no sometidos a ningún tratamiento posteriormente), Fig. 25 y aquellos operados y sometidos posteriormente al tratamiento con un inmunosupresor, Fig. 26. Los resultados demuestran que el nervio ciático en los animales control se encuentra algo desgajado y separado de su envuelta conjuntiva, Fig. 27, pero en general su estructura no presenta alteraciones en particular, aunque puede señalarse una cierta desorganización en las fibras. Pueden observarse ciertos acúmulos linfoides en las zonas en las que se seccionan los puntos de sutura, Fig. 28.

En los animales tratados con el inmunosupresor, se observa una buena estructura histológica del nervio ciático, Fig. 29. A mayor aumento pueden distinguirse algunas células de naturaleza macrofágica, Fig. 30. Sin embargo, la mayor parte de las células de naturaleza linfoides se observan en la periferia del nervio, por fuera de su envuelta y alrededor de las zonas correspondientes a los puntos de sutura, Fig. 31.

2.- Resultados del estudio inmunohistoquímico

2.a- Localización inmunohistoquímica de Timocitos y células T :

La observación del inmunomarcaje contra timocitos y células T (CD 5) reveló reacción positiva en algunas células linfoides en el interior del nervio ciático y asociadas a la periferia del mismo y a los puntos de sutura en la zona medial del nervio, tanto de los animales control de 5 como de 11 semanas, Fig. 32. En los nervios procedentes de los animales sometidos a tratamiento durante 5 y 11 semanas con FK, la reacción inmunohistoquímica contra timocitos y células T es más débil, y se localiza principalmente en la envuelta conjuntiva que se halla rodeando al nervio y en algunas células periféricas al propio nervio, Fig. 33.

Fig. 25. Sección transversal en corte grueso de un nervio ciático de una rata control en su zona medial, donde se observan macrófagos y desorganización en sus fibras nerviosas. Tinción parafenilendiamina. (X50)

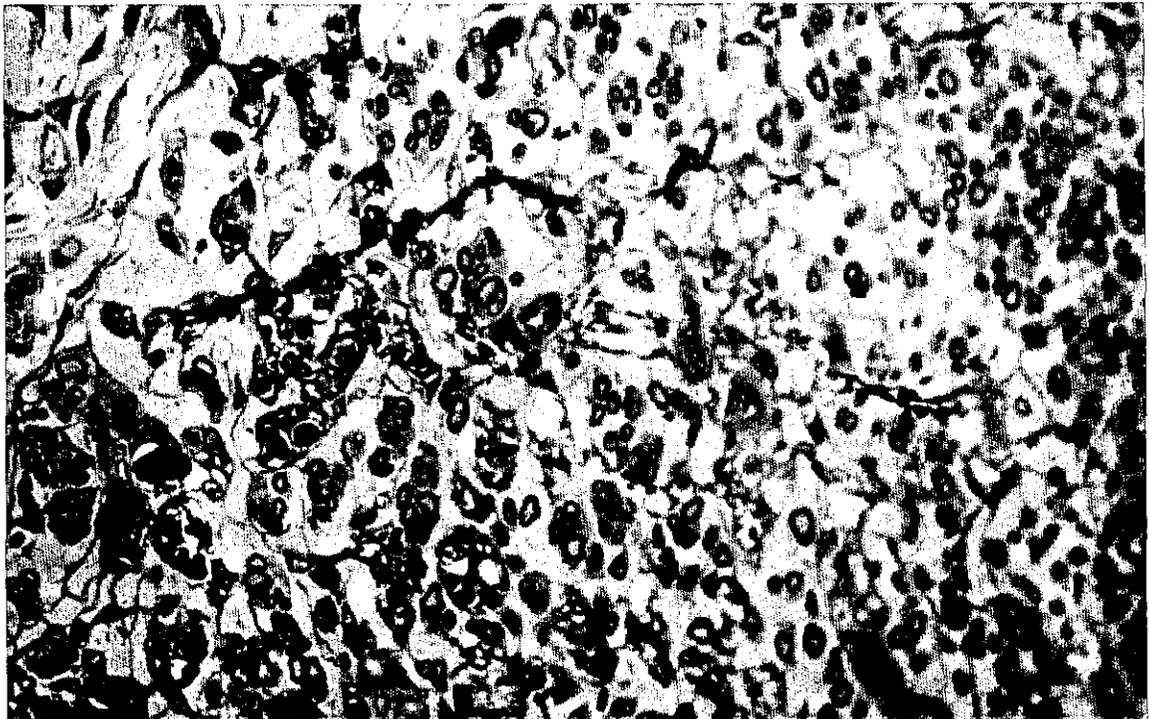


Fig 26. Corte grueso de una sección transversal de la zona distal de un nervio ciático de rata tratada durante 11 semanas, donde se observa una buena estructuración de las fibras de mielina. Tinción parafenilendiamina. (X50).

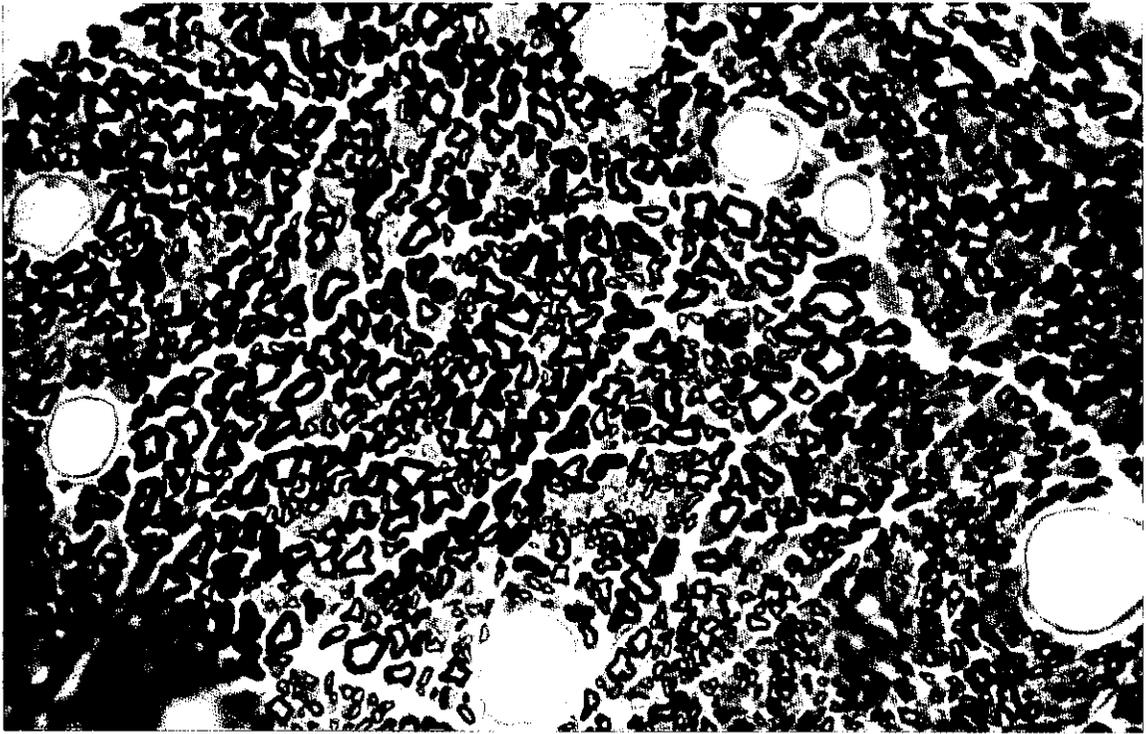


Fig. 27. Imagen a microscopía óptica de una sección trAnsversal de nervio ciático perteneciente a un animal control, donde se observan envueltas conjuntivas teñidas de azul, claramente alteradas. Tinción azul alcíán/hemalumbre/picrocarmín de índigo. (X 12.6).

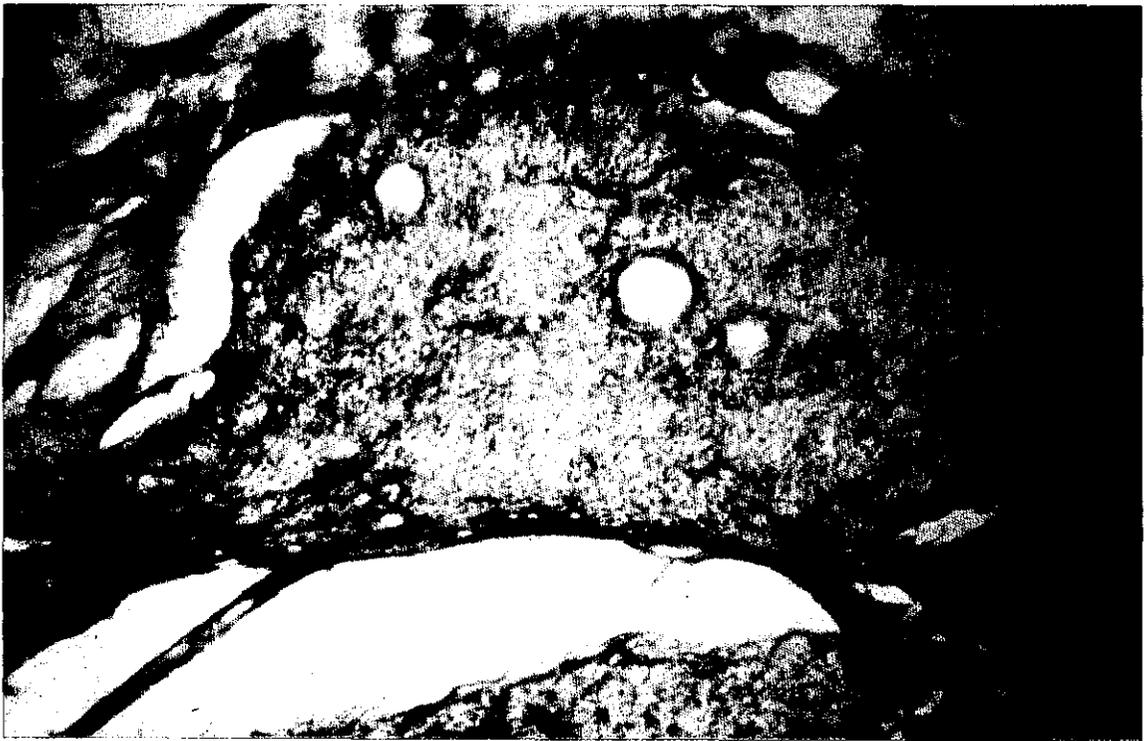


Fig. 28. Panorámica de una sección transversal en su zona medial del nervio ciático de una rata control, donde se observan acúmulos de células linfoides y desorganización. Tinción azul alcian /hemalumbre/picrocarmín de índigo. (X 7.875).



Fig. 29. Panorámica de un corte transversal de nervio ciático en su zona medial de una rata tratada con FK, donde se observan estructura general y envuelta conjuntiva bien organizadas y gran profusión de vasos sanguíneos. Tinción azul alcian/hemalumbre/picrocarmin de índigo. (X 7.875).



Fig. 30. Corte grueso de una sección transversal de la zona proximal del nervio ciático de una rata tratada durante 11 semanas, donde se observan células macrofágicas en el entorno de los numerosos capilares sanguíneos, junto a una excelente organización de fibras y envuelta conjuntiva del nervio. Tinción azul de toluidina. (X50).

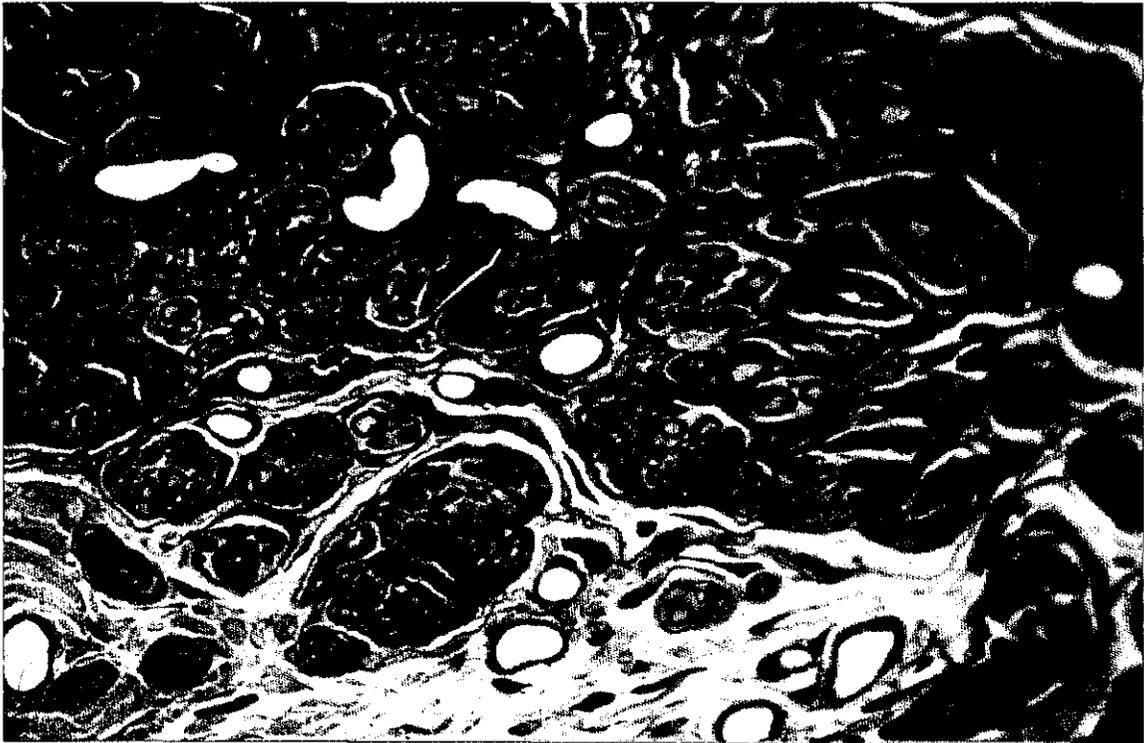


Fig. 31. Detalle del corte transversal de un nervio ciático en su zona medial perteneciente a una rata tratada, donde se observan acúmulos de células linfoides en torno a los vasos. Tinción azul alcian/hemalumbre/picrocarmín de índigo. (X20).

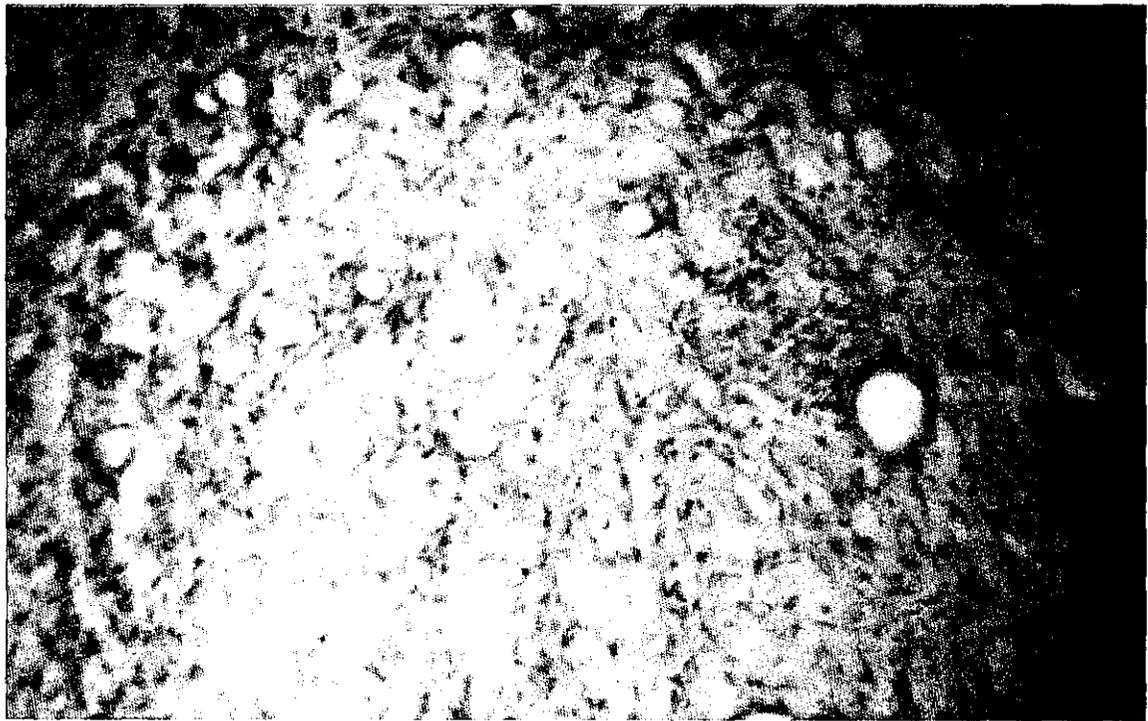


Fig. 32. Sección transversal del nervio ciático de una rata control de 11 semanas, que identifica timocitos y células T de rata (CD5), y donde se observan algunas células T marcadas en el interior del nervio. (X20).

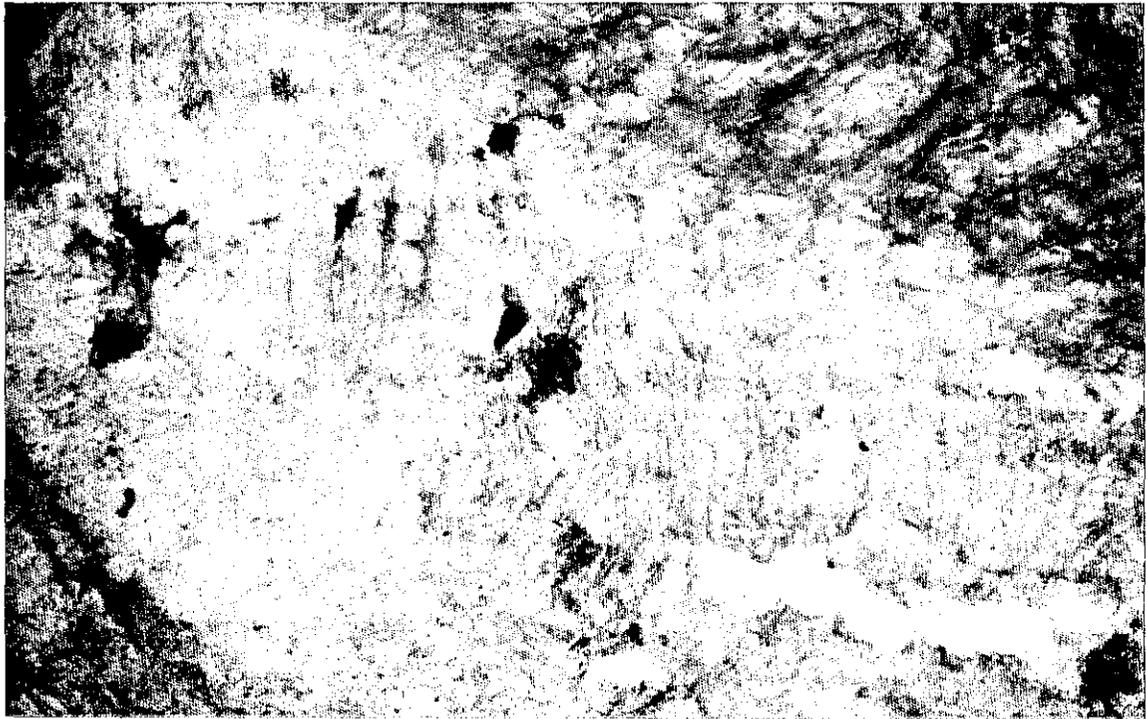


Fig. 33. Sección transversal de un nervio ciático de una rata tratada durante 11 semanas, que identifica timocitos y células T de rata (CD5), y donde se observa un débil marcaje celular en el interior del nervio. (X 7.875).



No se observó reacción alguna en ninguno de los controles negativos llevados a cabo paralelamente.

A la vista de estos resultados parece quedar demostrado que en los animales tratados con FK es menor la aparición de timocitos y células T periféricas, con respecto a los animales control.

2.b.- Localización inmunohistoquímica de células T citotóxicas (CD3):

La observación microscópica de la distribución inmunohistoquímica contra este antígeno en los animales control revela reacción positiva alrededor de los puntos de sutura, apareciendo también fuertemente marcado el interior del nervio ciático en la región medial operada, tanto de forma reticular, Fig. 34, como con numerosas células, Fig. 35. En las regiones proximal y distal la reacción inmunohistoquímica es mucho más débil.

En los nervios procedentes de los animales tratados con FK tras la operación la reacción inmunohistoquímica contra este antígeno resulta mucho más débil, tanto a nivel de los puntos de sutura, como en el interior del propio nervio. Sin embargo es de destacar que en los animales tratados durante 5 semanas con FK, Fig. 36, la reacción es algo más intensa que en aquellos tratados con el inmunosupresor durante 11 semanas, en los que la reacción tiene una distribución a modo de enrejado o en algunas células dispersas débilmente inmunomarcadas, Fig. 37.

No se observó reacción alguna en ninguno de los controles negativos llevados a cabo paralelamente.

Parece deducirse a la vista de estas observaciones que en los animales tratados con FK la aparición de subpoblación de las células T periféricas (CD 8) la mayor parte de las NK y los leucocitos granulares intraepiteliales es menor que en aquellos animales control.

Fig 34. Corte transversal de la región medial de un nervio ciático de rata control de 5 semanas, que identifica timocitos y células T de rata (CD8), y donde se observa reacción inmunopositiva en el interior del nervio. (X20).

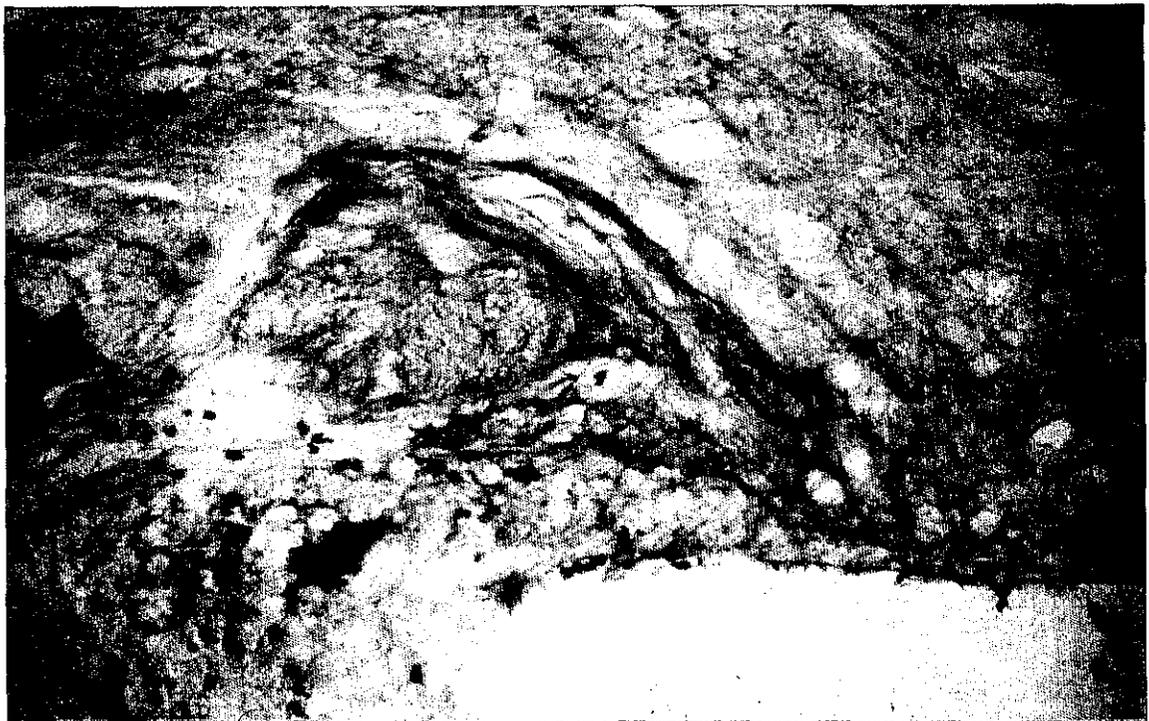


Fig. 35. Corte transversal de la región medial de un nervio ciático de una rata control de 11 semanas, que identifica células T periféricas (CD8), y donde se observa reacción inmunopositiva en numerosas células del nervio. (X20).

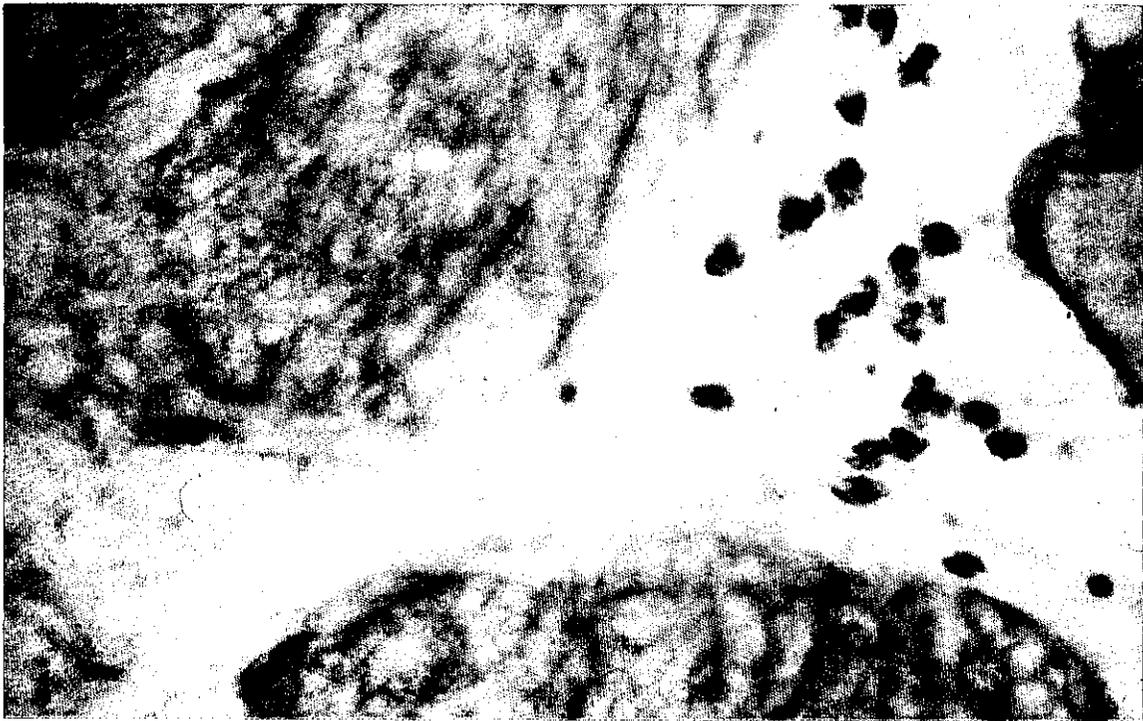


Fig. 36. Corte transversal de la región medial del nervio ciático de rata control de 5 semanas, que identifica células T periféricas (CD 8) y donde se observa reacción inmunopositiva escasa en el interior del propio nervio y asociada a la zona de sutura. (X20).



Fig. 37. Corte transversal de la región medial del nervio ciático de una rata tratada durante 11 semanas, que identifica células T periféricas (CD8), y donde puede observarse reacción inmunopositiva débil en algunas células del interior del nervio ciático (X20).



2.c.- Localización inmunohistoquímica de células T helper (CD 4) :

La observación microscópica del marcaje inmunohistoquímico contra este anticuerpo revela una reacción muy positiva asociada a la periferia de los puntos de sutura y en el interior del nervio ciático, tanto en la zona medial, como en la zona distal del propio nervio de los animales control. Los resultados observados son semejantes en los animales de 5 semanas y en aquellos de 11 semanas, Fig. 38.

En las muestras histológicas del material procedente de animales tratados con FK la reacción inmunohistoquímica contra este antígeno es más débil, observándose algo de positividad en torno a los puntos de sutura y en el interior del propio nervio, Fig. 39.

No se observó reacción alguna en ninguno de los controles negativos llevados a cabo paralelamente.

Queda demostrado con estos resultados experimentales que la población de células T periféricas (T-helper) y macrófagos es menor en los animales tratados con FK y que el tratamiento prolongado (11 semanas) hace que disminuya aún más la aparición de estas estirpes celulares.

2.d.-Localización inmunohistoquímica de macrófagos y células dendríticas:

En los animales control tanto de 5 como de 11 semanas, la reacción inmunohistoquímica positiva contra este antisuero aparece intensa tanto en los puntos de sutura, como en el interior del propio nervio ciático y tanto en la región medial como en la proximal y distal de los animales control, Fig. 40.

En los nervios ciáticos procedentes de los animales tratados con un inmunosupresor la reacción inmunopositiva frente a este antisuero resulta más débil, si se compara con el grupo precedente. La reacción es débil en las zonas de las suturas y en las regiones medial, proximal y distal. Aparentemente no se aprecian diferencias entre el marcaje observado a las 5 y a las 11 semanas de tratamiento experimental, Fig. 41.

Fig. 38. Corte transversal de la región medial del nervio ciático de una rata control de 5 semanas, que identifica célula T periféricas (CD4) y donde se observa una reacción positiva asociada a la zona de sutura. (X20).

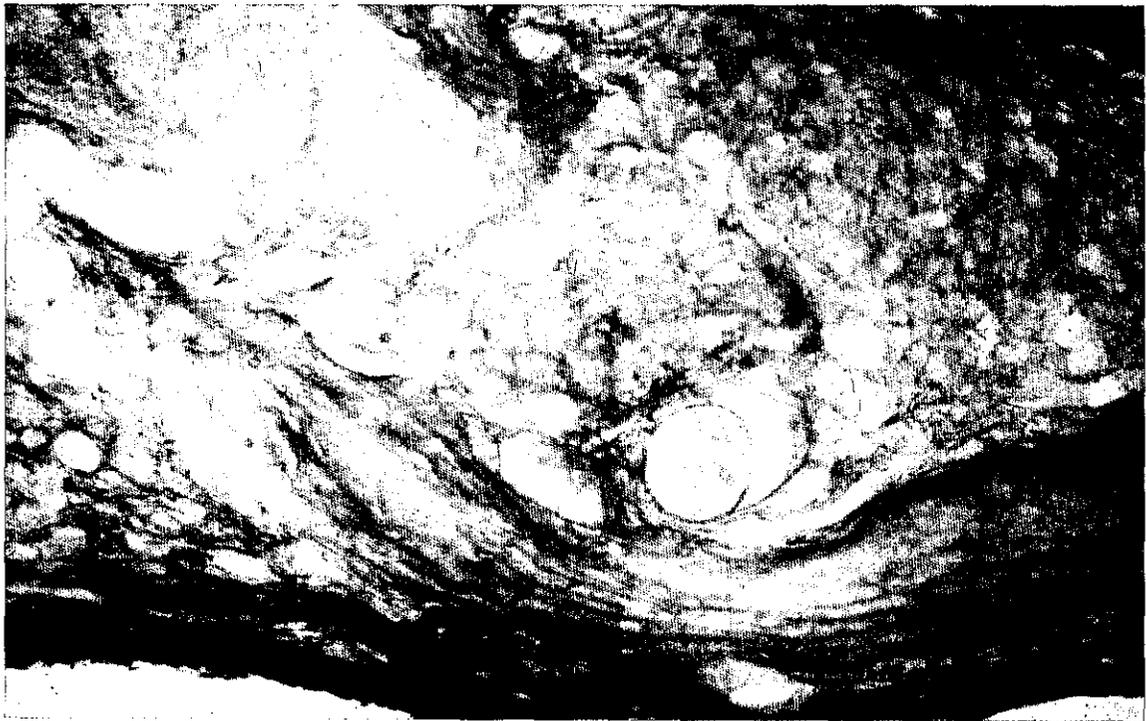


Fig. 39. Corte transversal de la región medial del nervio ciático de una rata tratada durante 5 semanas, que identifica células T periféricas (CD4) y donde puede observarse reacción inmunopositiva más débil que en la rata control, alrededor de los puntos de sutura (X12.6).



Fig. 40. Corte transversal de la región medial del nervio ciático de una rata control de 11 semanas, que identifica macrófagos y células dendríticas, y donde puede observarse reacción inmunopositiva en numerosas células del interior del nervio, apareciendo el marcaje con una disposición de tipo reticular. (X20).

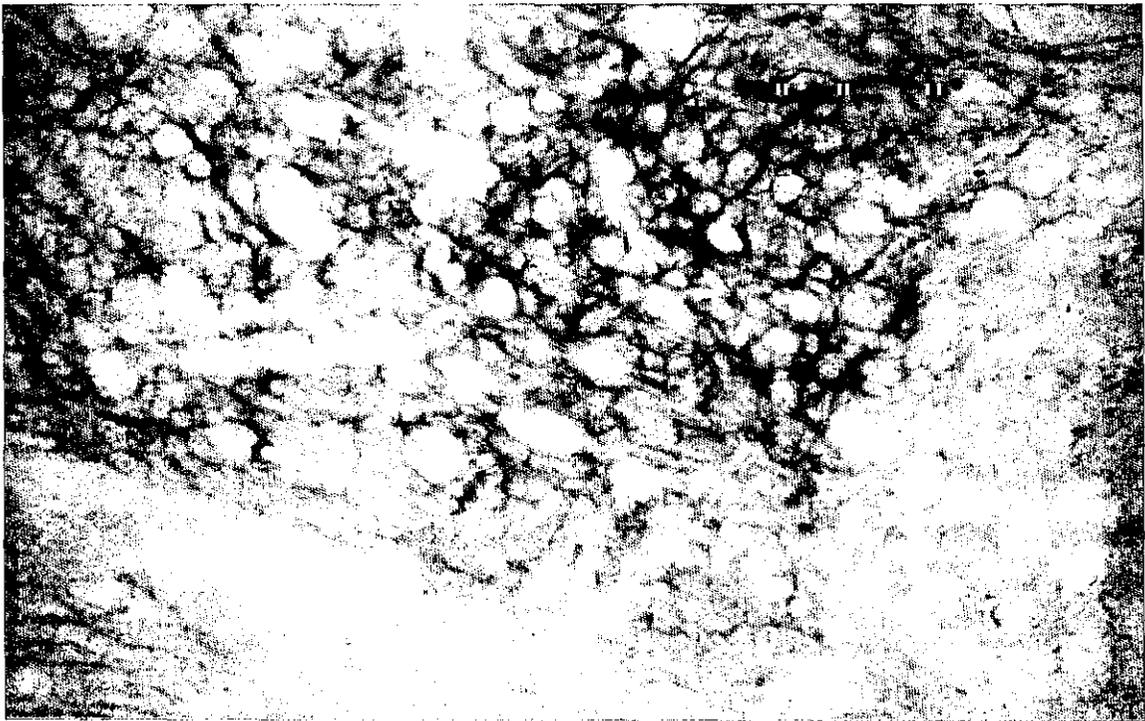
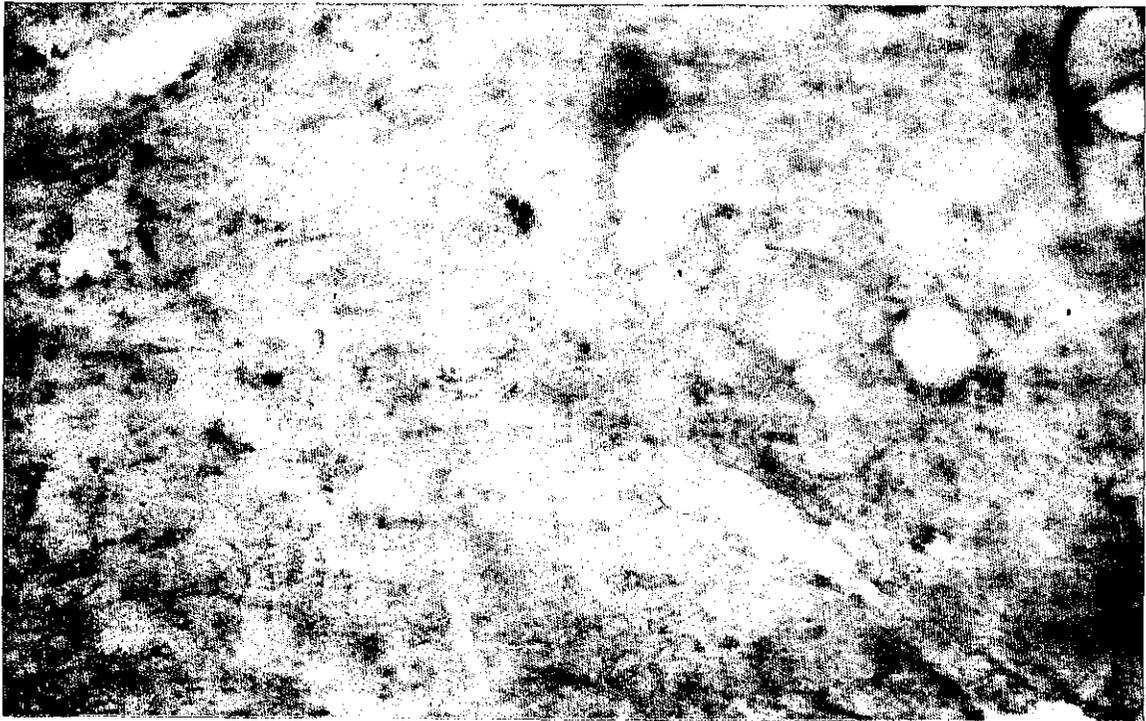


Fig. 41. Corte transversal del nervio ciático de una rata tratada durante 5 semanas, que identifica macrófagos y células dendríticas, y donde puede observarse una reacción inmunopositiva débil en comparación con el control, en el interior del nervio. (X20).



No se observó reacción alguna en ninguno de los controles negativos llevados a cabo paralelamente.

A la vista de los resultados experimentales observados parece poder concluir que el tratamiento con FK (5 y 11 semanas) hace que disminuya la aparición de macrófagos, granulocitos y células dendríticas, con respecto a los animales controles no tratados.

2.e.- Localización inmunohistoquímica del CMH clase I (Ag RT 1 Aa de rata):

En las secciones procedentes de los animales control el inmunomarcaje positivo contra CMH de clase I se observa preferentemente en la zona en la que se encuentran los puntos de sutura, y formando una estructura en forma de entramado en el interior del nervio ciático tanto en la región medial como en las proximales y distales. Así mismo esta distribución se observa tanto en los animales de 5 semanas como en los de 11 semanas, Fig. 42.

En los nervios ciáticos procedentes de animales tratados durante 5 y 11 semanas con FK la reacción presenta una distribución semejante, asociada a los puntos de sutura y formando un entramado de naturaleza reticular en el interior de las secciones transversales de los nervios ciáticos. La distribución de la reacción inmunohistoquímica positiva es semejante en las secciones medial, proximal y distal del nervio ciático, Fig. 43.

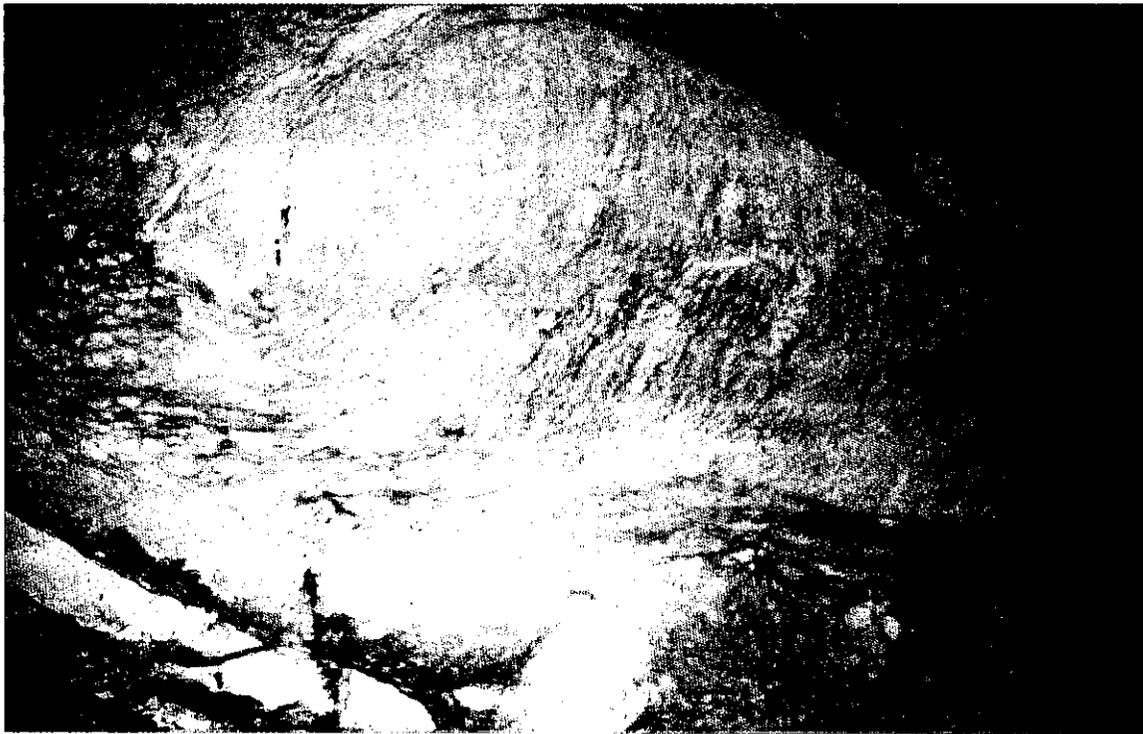
No se observó reacción alguna en ninguno de los controles negativos llevados a cabo paralelamente.

A la vista de estos resultados puede decirse que el tratamiento con FK hace disminuir la reacción contra CMH de clase I, con respecto a los animales control.

Fig. 42. Sección transversal de la región distal del nervio ciático de una rata control de 5 semanas, que identifica al Ag RT1Aa de rata, equivalente al CMH de clase I del hombre, y donde puede observarse inmunorreacción positiva en numerosas células en el interior del nervio. (X20).



Fig. 43. Sección transversal de la región medial de un nervio ciático de una rata tratada durante 5 semanas, que identifica al Ag RT1Aa de rata, equivalente al CMH de clase I del hombre, y donde puede observarse reacción positiva débil en el interior del nervio, con una disposición de tipo reticular. (X7.875).



2.f.- Localización inmunohistoquímica del CMH clase II (Ag IaE de rata):

En las muestras procedentes de los animales no sometidos a tratamiento con FK la reacción inmunocitoquímica contra este antisuero se observa en numerosas células dispersas por el propio nervio ciático como asociadas o rodeando a los puntos de sutura, no observándose diferencias significativas entre el marcaje observado a las 5 y 11 semanas, Fig. 44.

En las muestras procedentes de los animales tratados con FK la reacción aparece más débil que en el grupo de animales control, apareciendo cierta reacción alrededor de los puntos de sutura y cierta reacción inmunopositiva dispersa en el interior del nervio, Fig. 45.

No se observó reacción alguna en ninguno de los controles negativos llevados a cabo paralelamente.

Por lo tanto, puede decirse que el tratamiento con FK produce una disminución en el marcaje específico contra este antígeno.

3.- Resultados del estudio electrofisiológico

La evidencia de regeneración electrofisiológica se observó a los 3 meses en 33 de las 40 ratas tratadas con FK-506. Por contra, en sólo 13 de las 40 ratas control en el mismo tiempo se apreció regeneración en el mismo período de tiempo. La media en la conducción nerviosa del nervio ciático fue de 42.5 m/seg (DS, 3.9). La media de velocidad de conducción motora a los tres meses en los animales que recibieron inmunosupresión con FK fue de 26.1 m/seg (DS, 5.0), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la conducción media de 18.1 m/seg (DS, 4.6) en los animales control. La diferencia en la velocidad de conducción entre los dos grupos no fue evidente hasta que la regeneración tuvo lugar entre las ocho y diez semanas. Una diferencia similar pero más pronunciada se apreció en las amplitudes de los potenciales de la acción muscular. La amplitud media preoperatoria fue de 10.7 mv (DS, 1.9). A los tres meses del postoperatorio, la amplitud media en los animales tratados con FK fue de 3.8 mv (DS, 1.8), donde en los

Fig. 44. Corte transversal de la región medial del nervio ciático de una rata control de 5 semanas, que identifica al Ag Ia de rata equivalente al CMH de clase II del hombre, y donde pueden observarse numerosas células inmuopositivas en torno a la zona de sutura. (X20).

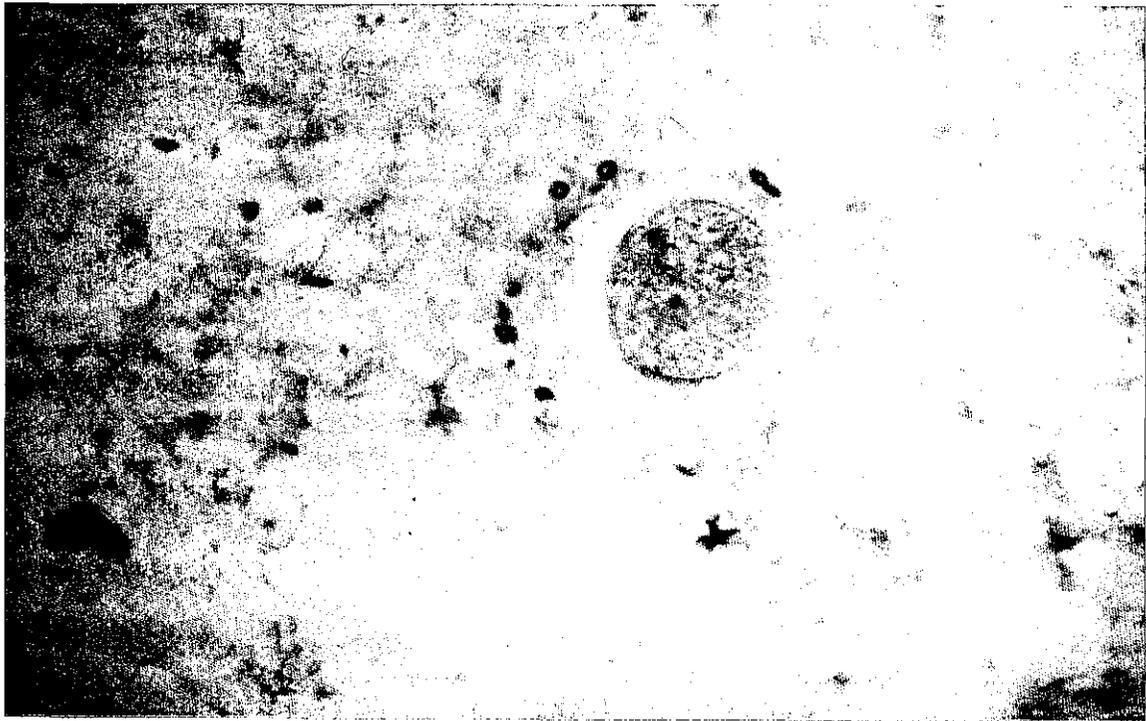
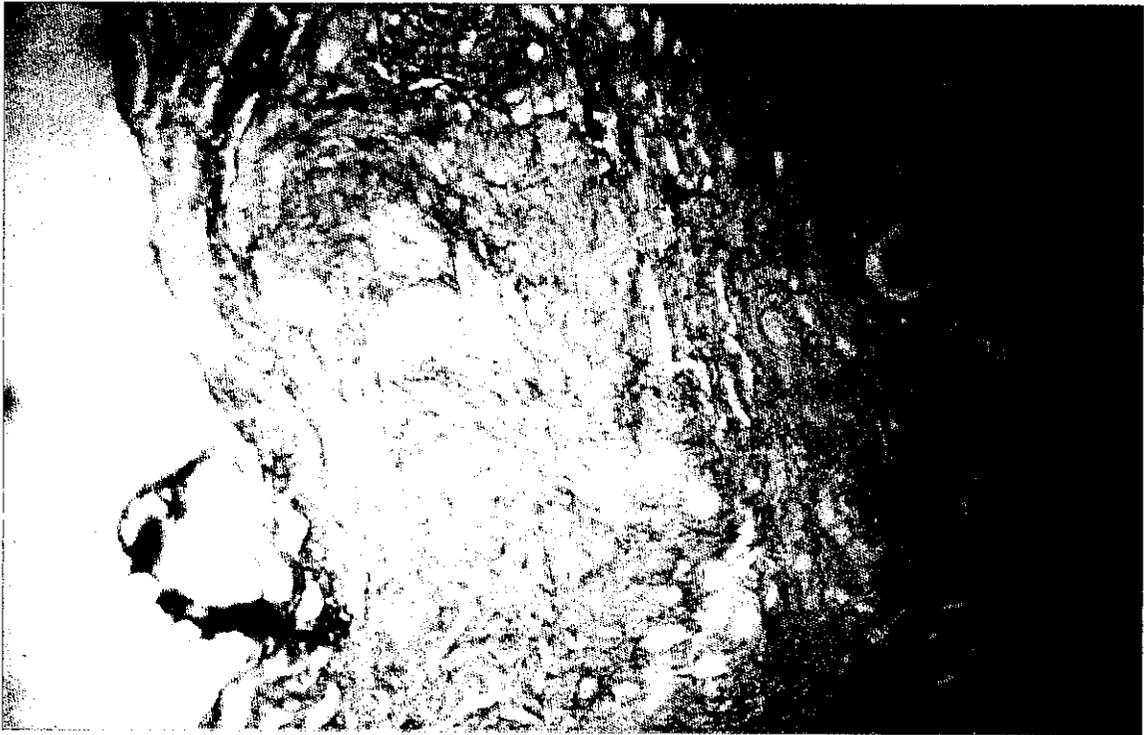


Fig. 45. Corte transversal de la región medial de un nervio ciático de rata tratada durante 5 semanas que identifica al Ag Ia de rata, equivalente al CMH de clase II del hombre, y donde puede observarse cierta reacción en torno a los puntos de sutura, aunque más débil que en el control. (X20).



animales control fue de 1.7 mv (DS, 1.1). La diferencia es significativa ($p < 0.01$).

Una vez registrados los resultados de la electrofisiología, Tablas I y II se pudo apreciar que sólo existieron diferencias significativas, $p < 0.01$, en el período de las dos semanas en el grupo control cuando se compara con el mismo período de las ratas tratadas y con el resto de períodos.

Así en el grupo de las ratas control a las 2 semanas se apreció que para un estímulo medio de 41.06% ($r=21-64$) apareció una respuesta contráctil del 63.06% ($r=60-152$).

Frente a esto se comprobó como en el grupo de las ratas tratadas, también a las dos semanas del trasplante, se registró una respuesta del 100.80%, con un estímulo del 51.85% de promedio ($r=20-117$).

En el resto de periodos estudiados y grupos se alcanzó el 100% de respuesta con estímulos que rondaron el 50%. Comparando estos grupos entre sí no se apreció diferencias significativas. Se exceptúa el grupo de ratas tratadas en el período de las 10 semanas donde se precisó un estímulo medio del 72% ($r=28-177$) para alcanzar un 94.12% de promedio de respuesta contráctil muscular.

La comparación de la necesidad de estímulo en el grupo de ratas tratadas a las 10 semanas, fue significativamente mayor que en el resto de períodos estudiados e independientemente del grupo de ratas comparado, $p < 0.01$, Fig. 48.

4.- Resultado del estudio morfométrico por análisis de imagen:

A nivel de la microscopía óptica la observación de las cortes histológicas nos ha permitido poner de manifiesto ligeras diferencias entre unas muestras y otras. En las muestras procedentes de los animales control (no tratados con el inmunosupresor), se observan numerosas células de

TABLA I: ESTUDIO ELECTROFISIOLOGICO

	1-CONTROL-1B-I	1-CONTROL1B-D	2-CONTROL-1B-I	2-CONTROL-1B-D	3-CONTROL-3B-I	3-CONTROL-3B-D
1	46	64	24	20	21	62
2	93	100	91	95	90	95
3	35	213	28	45	21	26
4	134	99	110	137	90	111
5	30	40	31	28	204	54
6	96	102	83	103	107	100
7	50	32	65	72	27	110
8	76	143	101	75	92	111
9	57	62	32	55	37	92
10	77	103	81	120	97	92

	4-CONTROL-3B-I	4-CONTROL-3B-D	5-CONTROL-1B-I	5-CONTROL-1B-D	6-TRATADA-2B-I	6-TRATADA-2B-D
1	41	39	43	55	25	29
2	95	97	130	123	116	75
3	38	47	33	23	29	41
4	160	97	84	104	124	82
5	42	102	41	43	43	42
6	130	133	117	100	179	111
7	36	45	42	38	34	26
8	86	173	92	107	67	123
9	48	115	70	25	45	42
10	70	113	94	104	90	119

	7-TRATADA-2B-I	7-TRATADA-2B-D	8-TRATADA-4B-I	8-TRATADA-4B-D	9-TRATADA-4B-I	9-TRATADA-4B-D
1	20	21	61	36	27	60
2	95	90	77	111	92	100
3	22	40	51	71	29	21
4	122	87	64	84	100	123
5	121	83	43	27	68	50
6	96	109	102	103	123	80
7	26	36	33	104	53	68
8	169	111	84	104	86	116
9	64	115	64	28	177	41
10	89	86	89	96	97	87

	11-CONTROL-1A-I	11-CONTROL 1A-D	12-CONTROL-3A-I	12-CONTROL-3A-D	13-CONTROL-3A-I	13-CONTROL-3A-D
1	60	55	23	55	22	27
2	121	105	152	109	122	137
3	•	•	•	•	•	•
4	•	•	•	•	•	•
5	29	52	41	45	27	65
6	134	80	107	144	155	110
7	37	24	50	41	61	26
8	70	162	94	178	152	103
9	•	•	•	•	•	•
10	•	•	•	•	•	•

	14-TRATADA-2A-I	14-TRATADA-2A-D	15-TRAT-2A-I	15-TRAT-2A-D	16-TRAT-2A-I	16-TRAT-2A-D	17-TRAT-4A-I
1	75	38	56	104	74	36	117
2	109	115	130	94	101	88	93
3	65	56	63	28	24	50	87
4	104	100	107	125	108	106	114
5	29	27	•	•	74	81	25
6	134	103	•	•	90	109	92
7	•	•	•	•	•	•	•
8	•	•	•	•	•	•	•
9	•	•	•	•	•	•	•
10	•	•	•	•	•	•	•

	17-TRAT-4A-D	18-TRAT-4A-I	18-TRAT-4A-D	19-TRAT-4B-I	19-TRAT-4B-D	20-CONTR-1A-I	20-CONTR-1A-D
1	40	27	39	107	45	•	•
2	107	100	102	121	100	•	•
3	31	•	•	43	71	•	•
4	122	•	•	155	74	•	•
5	46	47	51	•	•	•	•
6	132	100	109	•	•	•	•
7	•	•	•	•	•	•	•
8	•	•	•	•	•	•	•
9	•	•	•	•	•	58	39
10	•	•	•	•	•	103	100

TABLA II: ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

		CONTROL			TRATADAS	
2 SEM	n=16	E=41.06%	r=21-64	n=20	E=51.85%	r=20-117
		R=63.06%	r=60-152		R=100.80%	r=77-130
3 SEM	n=10	E=50.90%	r=21-213	n=20	E=45.66%	r=21-87
		R=112.60%	r=84-137		R=95.05%	r=82-155
4 SEM	n=16	E=54.62%	r=27-204	n=16	E=53.56%	r=25-121
		R=112.56%	r=80-155		R=104.50%	r=80-179
5 SEM	n=16	E=47.25%	r=27-110	n=8	E=47.50%	r=26-104
		R=113.43%	r=70-178		R=107.50%	r=67-169
10 SEM	n=10	E=59.30%	r=25-115	n=8	E=72.00%	r=28-177
		R=95.10%	r=70-120		R=94.12%	r=86-119

E=Estímulo (%)

R=Respuesta (%)

r=Rango

n=muestra

naturaleza macrofágica entre los paquetes de fibras mielínicas. Así mismo, en estas muestras se observa cierta desorganización en las fibras nerviosas, Fig. 46. Estas observaciones aparecen tanto en la región medial operada como en las secciones proximal y distal del correspondiente nervio ciático.

La observación de las muestras histológicas pertenecientes a aquellos animales operados y sometidos posteriormente al tratamiento con un inmunosupresor nos ha permitido poner de manifiesto que histológicamente la estructura del nervio se mantiene en excelentes condiciones, tanto a nivel del propio nervio ciático como en la envuelta conjuntiva que se halla rodeándolo, Fig. 47. A este nivel pueden observarse también algunas estructuras celulares de naturaleza macrofágica, aunque en menor número que el observado en los animales control, generalmente asociadas a los numerosos vasos sanguíneos que se encuentran en el interior de la sección transversal del nervio. Las regiones proximal y distal presentan unas características histológicas semejantes a las observadas en la región medial de los animales tratados: una buena conservación de la estructura histológica y un número relativamente escaso de células de naturaleza macrofágica. En estas regiones son numerosos los vasos sanguíneos que discurren paralelos a la dirección del nervio ciático.

En lo referente al estudio morfométrico de las muestras histológicas observadas, el análisis de imagen ha permitido cuantificar la densidad de fibras nerviosas por μ^2 en una muestra de 20 nervios pertenecientes a 10 ratas por grupo, operadas bilateralmente.

Los resultados obtenidos, Tabla III, muestran que del total de los animales estudiados, es la zona proximal del nervio operado en los animales tratados durante 11 semanas la que presenta una media de regeneración axonal muy próxima a la media obtenida para la zona medial del nervio en el mismo grupo de animales, siendo esta ligeramente menor para su zona distal.

En la misma línea, la media de resultados globales para los cuatro grupos estudiados refleja un patrón de regeneración similar entre ellos, destacando siempre un mayor número de fibras en la zona proximal y medial de los nervios estudiados con una diferencia escasa entre ellos y siendo mayor la regeneración en el segmento proximal, lo cual contrasta con

TABLA III: ESTUDIO MORFOMETRICO DE FIBRAS NERVIOSAS

N°	Muestra n=20	N°Fibras M	Area medida(μ^2) M	N°Fibras/100(μ^2) M
1	TP-11 S	6280	120721,07	5,20
2	TM-11 S	5610	113942,82	4,92
3	TD-11 S	5046	105008,82	4,80
4	TP-5 S	5804	125125,58	4,63
5	TM-5 S	5455	119595,57	4,56
6	TD-5 S	5133	115237,16	4,45
8	CP-11 S	6844	154994,88	4,41
9	CM-11 S	4321	100292,49	4,30
10	CD-11 S	4531	114972,87	3,94
11	CP-5 S	3864	103500,73	3,73
12	CM-5 S	4408	132752,81	3,32
13	CD-5 S	2867	107985,87	2,65

T= Grupo de animales tratados.

C= Grupo de animales control.

P= Zona proximal al nervio ciático trasplantado.

M= Zona medial del nervio ciático trasplantado.

D= Zona distal al nervio ciático trasplantado.

5 S= 5 semanas.

11 S= 11 semanas

Fig 46. Sección transversal de un nervio ciático de una rata control en su zona medial, donde se observa desorganización de las fibras mielínicas periféricas y células de naturaleza macrofágica. Tinción parafenilendiamina. (X50).

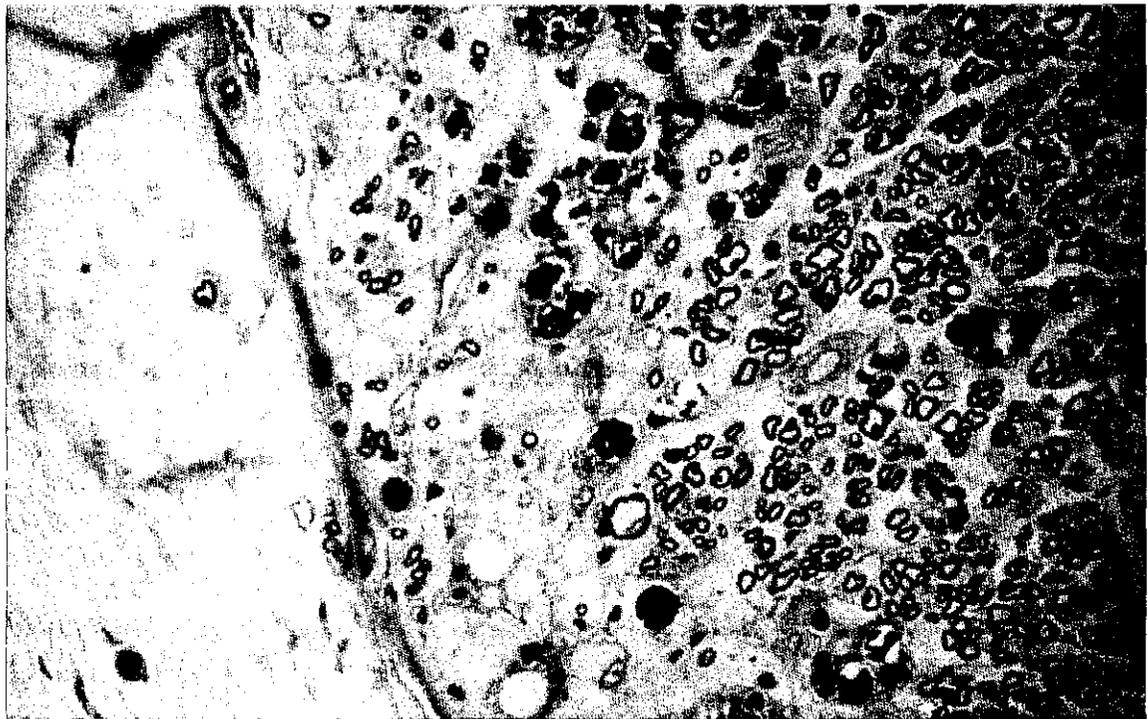
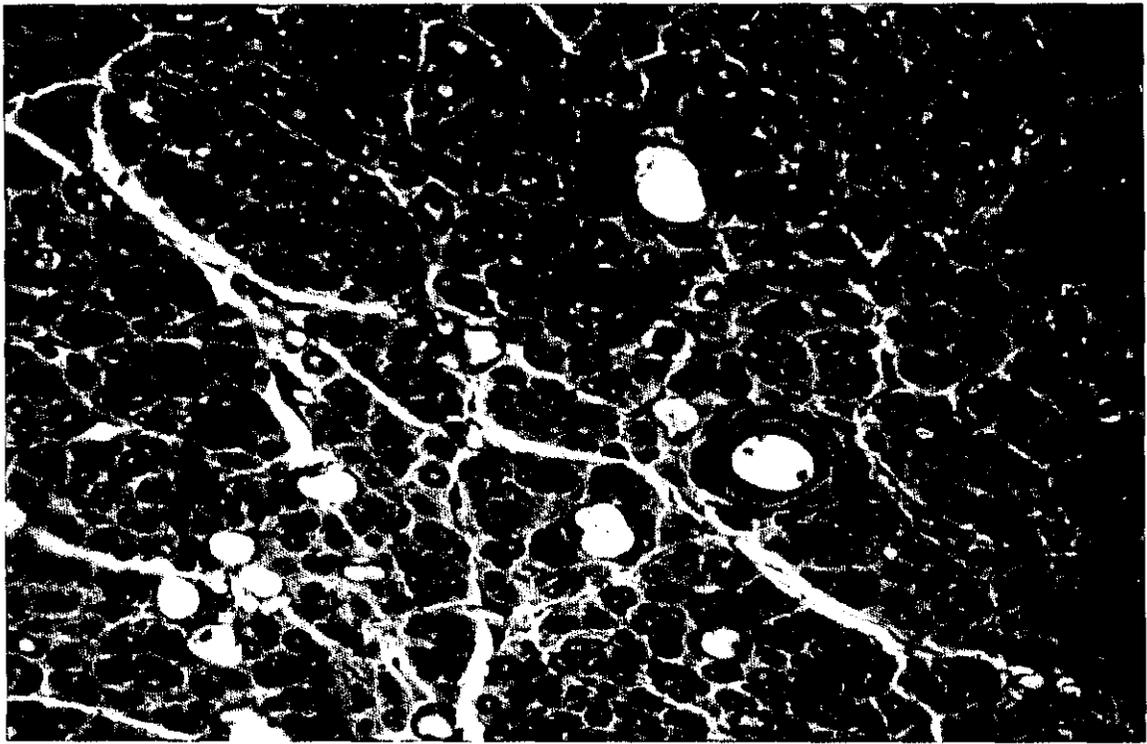


Fig. 47. Corte grueso de una sección transversal de un nervio ciático de rata tratada durante 11 semanas, donde se observan algunas células de naturaleza macrofágica y una estructura de las fibras nerviosa que en general es buena y bien organizada. Tinción azul de toluidina. (X50).



ELECTROFISIOLOGIA

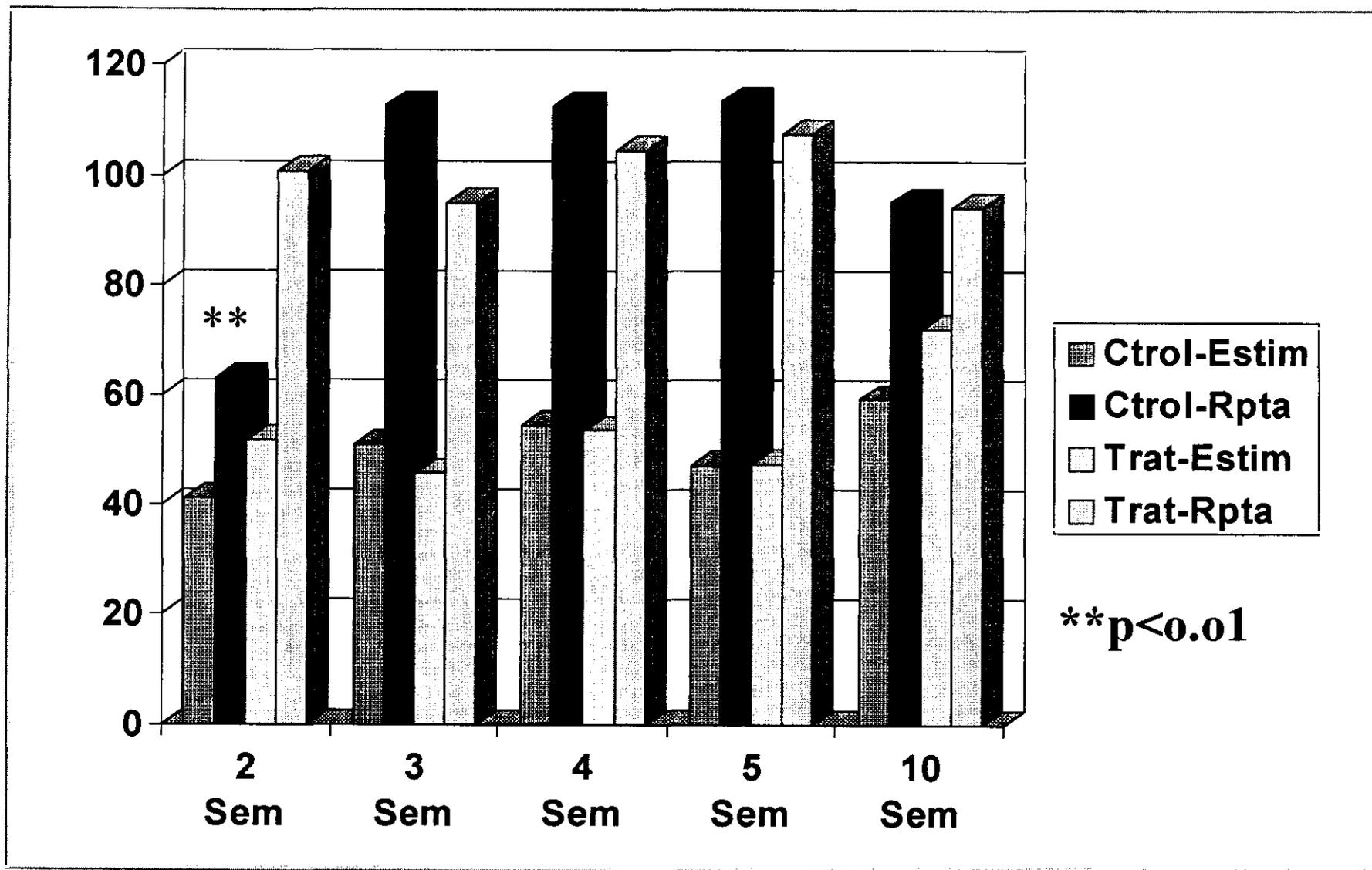


Fig. 48. Estudio electrofisiológico.

FK-506

la zona distal donde el número de fibras cuantificadas es comparativamente inferior en todos los grupos estudiados.

En cuanto al resultado comparativo de los 4 grupos de animales, la media de axones cuantificados es claramente superior en el grupo de ratas tratadas con inmunosupresor y aún mayor en aquellos en que el tratamiento se prolongó hasta un total de 11 semanas, respecto a los grupos control que no recibieron tratamiento, y especialmente los que fueron sacrificados en un plazo menor, de 5 semanas, donde la regeneración fué sensiblemente menor.

IV.- DISCUSION

1.- EFECTOS BIOLÓGICOS DEL FK 506 Y SU ACTIVIDAD AUTOINMUNE.

Durante mucho tiempo la regeneración del tejido nervioso periférico ha sido motivo de investigación y controversia. Desde que **Waller**²⁶², hace más de un siglo, describió la degeneración nerviosa en una fibra lesionada, y su posterior regeneración desde el extremo proximal del nervio afectado, han sido muchos los científicos que han profundizado en este aspecto, y numerosos los procedimientos conservadores y quirúrgicos que se han ido desarrollando a lo largo de este tiempo en un intento de hallar una recuperación del tejido nervioso periférico lesionado.

Superada la idea de que los nervios podían regenerar espontáneamente y que su manipulación podría impedir su funcionalidad, no es hasta mediados del siglo XIX, cuando comienza a aceptarse la reparación de un nervio periférico lesionado mediante la sutura de su tejido conjuntivo.

Es en este último siglo cuando se producen avances significativos en el desarrollo de la cirugía, perfeccionándose técnicas quirúrgicas concretas, que posteriormente y ya en los últimos años se han asociado a medidas capaces de acelerar la regeneración axonal, tales como el empleo de sustancias neurotróficas o cultivos de células de Schwann, **Weinberg**²⁶⁴, **Ikeda**¹⁰⁹, o la aplicación de campos electromagnéticos pulsátiles, **Raji**²⁰⁴.

Sin embargo, en los últimos tiempos, se ha visto incrementado el número de accidentes y lesiones traumáticas, que han originado a su vez, un aumento en la necesidad de disponer de tejido nervioso adicional para hacer frente a defectos de magnitud y extensión importantes. En esta línea, cirujanos como **Barnes**¹¹, **Guttman**⁹³, y **Seddon**²¹⁷, realizaron experimentos trasplantando nervio periférico tanto en animales como en humanos ya a mediados de nuestro siglo.

Habiendo definido **Hubbel**¹⁰⁷ con anterioridad, el autoinjerto como material ideal para el trasplante, fue sin embargo mayor el incremento en la experimentación con aloinjertos, debido a la imposibilidad de que un

mismo individuo pudiera disponer de material suficiente para hacer frente a defectos importantes del tejido. Por ello, tras importantes avances en el tratamiento conservador y quirúrgico del nervio periférico, en la actualidad, el trasplante alogénico de tejido nervioso periférico, además de ocupar un papel esperanzador y relevante en el tratamiento de su patología, puede ser considerado como el tratamiento con mayores expectativas de futuro en nuestros días.

Sin embargo, la regeneración nerviosa esperada tras un trasplante, con frecuencia se ha relacionado con fenómenos de rechazo, que ya **Mackinnon**¹⁵⁵ defendió como responsables del fallo del aloinjerto, el cual mostraba una reacción inflamatoria difusa y una fibrosis secundaria, que fueron atribuidas a una reacción inmune del huésped. Es por tanto la posibilidad de rechazo la principal amenaza del éxito del trasplante alogénico, y es por ello que en los últimos años se han estudiado y propuesto múltiples procedimientos encaminados a disminuir o hacer desaparecer el rechazo del tejido trasplantado. En la presente investigación, las fibras nerviosas no sometidas a tratamiento inmunosupresor muestran acúmulos de células linfoides en su interior así como de naturaleza macrofágica, Fig. 27 y sus fibras se hallan desgajadas y separadas de su envuelta conjuntiva, Fig. 28, a diferencia de las tratadas cuya estructura se mantiene en perfectas condiciones, Figs. 29 y 31.

Así, en el año 1943, en un intento de disminuir la capacidad antigénica del injerto, **Weiss**²⁶⁵ inició las primeras técnicas de preservación de aloinjertos mediante el uso de la liofilización. Posteriormente **Marmor**¹⁶¹ utilizó la irradiación previa y **Afanisief**⁴ años después, los aloinjertos preservados en solución de cialita. En el mismo ámbito, diversos investigadores ahondaron en el campo de la inmunología en un intento de incrementar las defensas del receptor, o minimizar la reacción inmunológica de rechazo, por ejemplo mediante el descubrimiento por **Dausset**⁴⁴, en 1958, de los marcadores antigénicos tisulares o sistema HLA, lo que ha permitido hacer una mejor selección de donantes y receptores.

Otros científicos intentaron con diversos procedimientos debilitar o anular el rechazo de los trasplantes, utilizando la irradiación corporal subletal y los corticoides. Pocos años después se introdujo la 6-mercaptopurina como droga inmunosupresora entre los recursos posibles

para inhibir el rechazo, lo que constituyó la base de la inmunodepresión con fármacos. Posteriormente, esta droga fue reemplazada por la azatioprina, un análogo de la 6-mercaptopurina. Estos agentes tenían la capacidad, al administrarse conjuntamente con los corticoesteroides, de actuar de forma sinérgica interfiriendo con distintas fases de la respuesta inmune.

Entre las adquisiciones más recientes e importantes, destaca el empleo de anticuerpos monoclonales como agentes inmunosupresores, y el descubrimiento de la CyA, introducida en la clínica humana en 1978 por *Calne*, y considerada hasta hace poco, como la droga inmunosupresora más importante de todos los tiempos.

Con estos hallazgos e investigaciones, que comienzan a mediados del siglo pasado, podemos concluir que siendo insuficiente la fuente de material nervioso autólogo en el ser humano, queda establecido el aloinjerto de nervio periférico como la estructura ideal para reparar lesiones de este tejido. Sin embargo, histológicamente, a pesar de que todos los alotrasplantes nerviosos, presentan un inicio de regeneración en su fase temprana, siempre están abocados al fracaso, que se produce por una importante reacción inflamatoria de predominio linfocítico, que conduce a la necrosis, fibrosis secundaria y subsecuente fallo. Es por esta razón por la que se hace necesario disminuir o anular la respuesta inmune del receptor frente al injerto. En el estudio que nos ocupa, ya se ha mencionado que las muestras control presentan una importante reacción inflamatoria así como desestructuración de sus fibras, no habiéndose observado fibrosis secundaria ni subsecuente fallo, Figs. 25 y 28.

Por otro lado, sabemos que este efecto depresor de la inmunidad se ha obtenido con algunos fármacos, y ha sido aplicado en anteriores trasplantes alogénicos de nervio. Sin embargo, dado que los efectos adversos de éstas drogas, incluida la CyA, han superado a las ventajas en este tipo de trasplantes, su utilización en el hombre en este caso no ha sido aconsejable.

El descubrimiento, en 1984, de un nuevo inmunosupresor de gran actividad, identificado inicialmente con el número de código del laboratorio como FK-506 y denominado posteriormente con el nombre genérico de Tacrolimus, ha mejorado considerablemente las expectativas del trasplante de órganos, demostrando un avance importante con respecto a la terapia

convencional con CyA, en el sentido de que reduce la incidencia de rechazo, que es la principal complicación postrasplante. Estos alentadores resultados han sido obtenidos experimentalmente en diversos órganos y tejidos y en ensayos clínicos en trasplante de hígado, riñón, y corazón. Presenta además este fármaco, un amplio margen de seguridad con menor incidencia de complicaciones infecciosas, hipertensión e hiperlipidemia. No constatándose tampoco, evidencia de hiperplasia gingival o ginecomastia y posibilitando un uso más bajo de corticosteroides orales.

La característica clave de FK-506 es su capacidad para inhibir específicamente la producción de Interleukina-2 y la activación de los receptores de Interleukina-2 en las células-T. Los estudios realizados demuestran que el efecto inmunosupresor *in vitro* es cien veces más potente que la terapia anterior estándar con CyA, y en estudios con animales, FK-506 es eficaz inhibiendo la proliferación de linfocitos con dosis 10 a 100 veces inferiores a CyA, **Sato**.²¹²

La similitud entre el mecanismo de acción y los efectos celulares de FK-506 y CyA, es sorprendente dadas las diferencias en su estructura química, **Heitman**¹⁰¹. Ambos agentes actúan en las primeras fases del proceso de activación de las células T, **Tocci**²⁴⁹. Como consecuencia, el efecto antiproliferativo de FK-506 solo se observa *in vitro* si se administra el medicamento durante las primeras horas después del estímulo que desencadena la activación de las células T. Cuando se administra durante la primera hora después de la activación, bloquea totalmente la proliferación de las células T y todos los eventos posteriores asociados con la función de estas células. Sin embargo, un retraso de 6 horas entre el estímulo activador y la administración del fármaco hace que éste tenga muy poco efecto sobre la proliferación de dichas células-T, **Schreiber**²¹⁴. En nuestro estudio, la droga inmunosupresora es aplicada al concluir la cirugía del trasplante, y posteriores dosis son administradas en días sucesivos pudiéndose observar un inmunomarcaje para linfocitos T más débil en los nervios tratados con FK506 que en aquellos no tratados, lo cual verifica la actividad antiproliferativa de esta droga sobre las células T en el tejido nervioso trasplantado, probablemente en relación a su administración temprana.

Ambas drogas poseen una marcada afinidad por las proteínas citoplasmáticas de las células inmunosupresoras (inmunofilinas). La

inmunofilina predominante a la que se une FK-506 en el citoplasma del linfocito T se denomina FKBP12. El complejo formado por la unión de ambas se ha propuesto como el desencadenante biológico responsable de la interacción con moléculas intracelulares implicadas en la señal de transducción, **Bierer**¹⁵. Así, dicho complejo se une a su vez competitiva y específicamente al complejo calcio dependiente, calmodulina-calcioneurina al cual inhibe, **Stewart**²³³, impidiendo de esta forma que progrese la señal de transducción que tiene por objeto la transcripción final de los genes del DNA celular que codifican la síntesis de IL-2, **Banerji**⁹.

FK-506 puede también intervenir selectivamente en la degradación de IL-2 y GM-CSF de las células T, lo que confirma su actividad reguladora de la expresión inmunogenética no sólo a nivel transcripcional sino también postranscripcional, **Hanke**⁹⁶.

La potente actividad inmunosupresora de este fármaco se debe no sólo a su inhibición sobre la inmunidad celular como hemos señalado, sino también a la actividad depresora sobre la inmunidad humoral. Así, FK-506, es capaz de inhibir la activación de las células B, en parte a través de su efecto sobre las células T y también directamente, bloqueando la transcripción del gen TN-alfa por el anticuerpo anti-Ig. FK-506 actúa en la última fase de la activación de las células B e inhibe de manera importante su proliferación, aún cuando se administra 24 horas después del estímulo activador, **Peters**¹⁹⁹. Este aspecto no ha sido objeto de nuestra investigación que se ha centrado en el estudio de la respuesta inmunitaria exclusivamente celular del FK 506, puesto que es la que media principalmente en la reacción de rechazo.

En cuanto a la experiencia preclínica llevada a cabo con FK-506, se ha demostrado que tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, esta droga constituye un potente inmunosupresor, que es 100 veces más potente que la CyA para inhibir las respuestas proliferativas de las células T *in vitro*, incluidas la reactividad mixta de los linfocitos y la producción de células-T citotóxicas, **Kino**¹³⁴. En varias especies animales, incluida la rata y el perro, FK-506 ha demostrado su eficacia en la prevención del rechazo del aloinjerto, por lo general a dosis de 10 á 100 veces menores que la dosis de CyA necesaria en los mismos modelos animales, **Peters**¹⁹⁹.

En los estudios de trasplantes de aloinjertos realizados en animales, se logró una supervivencia prolongada de los implantes con la administración postoperatoria de FK-506, aún en los casos en que comenzó a administrarse cuatro o cinco días después del trasplante, **Ochiai**¹⁸⁸. Sin embargo, no se obtuvo ningún beneficio cuando se administró la droga al donante o al receptor antes del trasplante.

La supervivencia prolongada de los aloinjertos hepáticos se ha demostrado en la rata, el perro y el mono, aunque los injertos de piel de los mismos animales donantes fueron rechazados, **Isai**¹¹². FK-506, también se ha asociado a la supervivencia prolongada de los implantes en modelos animales de trasplante renal, **Todo**²⁵². Así, la eficacia para prolongar la supervivencia de los aloimplantes hepáticos y renales, demostrada en los estudios animales, ha permitido considerar a FK-506 como un posible tratamiento nuevo para la prevención y el tratamiento del rechazo del implante alogénico.

2.- JUSTIFICACION DEL PLAN DE EXPERIMENTACION.

Según lo discutido hasta aquí, la inmunosupresión postrasplante de nervio periférico con FK 506 se presenta como una alternativa esperanzadora a los tratamientos actuales, los cuales tienen por objetivo común el mantenimiento del injerto, evitando la reacción de rechazo asociada con frecuencia al trasplante.

En el presente estudio, se ha elegido la rata como animal de experimentación por existir cepas distintas poseedoras de diferentes marcadores antigénicos, ratas Brown Norway como donantes y Wistar como receptoras. Ambas difieren en los antígenos de identidad tisular, codificados por los genes del complejo mayor y menor de histocompatibilidad, diferencia que deriva en el desencadenamiento de una respuesta de rechazo secundaria al trasplante. A su vez, esto ha permitido una mejor valoración del efecto inmunosupresor de la droga utilizada, FK 506. Basándonos igualmente en la experiencia de otros autores como **Adarsh**², **Mackinnon**¹⁵⁵, el nervio periférico estudiado ha sido

el ciático por su mayor accesibilidad, y el peso medio de las ratas utilizadas, ha sido de 250-300 mgr.

En lo que se refiere a las dosis del fármaco administradas, **Sato**²¹² destaca que en la rata, dosis de 0.1 a 0.3 mg/Kg/día i.m. son suficientes para suprimir el rechazo de trasplantes alogénicos de hígado, riñón, corazón y piel. **Nalesnik**¹⁸², realiza un estudio con varios grupos de ratas a las que administra dosis de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/Kg/día v.o. de FK 506, estudiando sus posibles efectos tóxicos tras diversos tiempos de tratamiento, que van desde 7 a 34 días. A pesar de que las dosis utilizadas son considerablemente superiores a las habituales en estos animales, los únicos efectos secundarios observados fueron la pérdida de peso inicial, el aumento de niveles de glucosa y la reducción del timo dosis-dependiente como indicador de la influencia directa que esta droga ejerce sobre el sistema inmune. En ningún caso se detectó evidencia de vasculitis, en contraste con su aparición frecuente en perros. A mayores dosis, FK 506 se asoció a nefro y hepatotoxicidad.

Otras experiencias, **Ochiai**¹⁸⁷, demuestran que dosis de 0.1, 0.32 y 1.0 mg/Kg/día administradas i.m. durante 5 días a la semana, logran aumentar la supervivencia del alotrasplante cardiaco en ratas hasta un 100%, especialmente las dosis de 0.32 y 1.0 mg /Kg/día. En contraste, el mismo efecto es conseguido con CyA a dosis muy superiores que van de 5 a 20 mg/Kg/día, **Ochiai**¹⁸⁷. Resultados que se confirman por otros autores como **Inamura**¹¹⁰, que utilizando dosis i.m. de 0.32 mg/Kg/día de FK 506, consigue de forma significativa prolongar la supervivencia del trasplante alogénico de piel en ratas, obteniendo el mismo efecto con CyA, a dosis de 32mg/Kg/día, comparativamente más altas que las de FK 506. En concordancia con estas experiencias, en el estudio que nos ocupa se han utilizado dosis de FK 506 de 0.32 mg/Kg/día administradas vía i.m. durante 5 y 11 semanas.

Kuroki¹⁴³ administra tratamientos cortos, de 14 días, postrasplante de miembro vascularizado en ratas, y estudia la regeneración nerviosa y recuperación funcional del injerto. Las ratas son tratadas con dosis de FK506 de 0.32 y 0.64 mg/Kg/día i.m. y con 15 mg/Kg/día de CyA. Se establecen además dos grupos comparativos de trasplante isogénico, donde no se produce rechazo, y trasplante alogénico sin tratamiento inmunosupresor,

donde se evidencia un fuerte rechazo muy precozmente. En los grupos de animales tratados, tanto con FK 506 a diferentes dosis, como con CyA, se demuestra una regeneración nerviosa satisfactoria que comienza a las 4 semanas postrasplante y que se mantiene un tiempo considerable tras suprimir la terapia inmunosupresora. En total, un 40% comienza a presentar un rechazo gradual de todos los tejidos iniciándose en la piel, y del 60% restante, un 40% sufrirá un rechazo progresivo y lento, mientras que un 20% sobrevivirá de forma indefinida tras la supresión de la terapia corta inmunosupresora, registrándose una supervivencia muy próxima en los tres grupos tratados, aunque destaca un ligero aumento en el índice de supervivencia del grupo que recibió FK 506 a dosis de 0.64 mg/Kg/día, respecto a los tratados con CyA y con 0.32 mg/Kg/día de FK506.

Buettemeyer²³, administra dosis superiores a las habituales, inmunosuprimiendo ratas con 2mg/Kg/día de FK 506 i.m. a las que se realiza trasplante alogénico de nervio ciático. En este caso, se prolonga el tratamiento durante 3 meses estableciéndose luego un grupo al que se mantiene una dosis intermitente de 2 mg/Kg/día dos veces por semana, durante dos meses más, y otro grupo al que se suspende la inmunosupresión durante el mismo tiempo. Los animales en los que se prolonga el tratamiento, aunque de forma discontinua, no presentan evidencia de rechazo, y por el contrario, éste se acaba produciendo en los casos en los que se suprime el tratamiento, evidenciándose un menor número de fibras regeneradas que no obstante consiguen mantener una discreta funcionalidad.

La mayoría de los autores utilizan FK 506 en terapia continua, administrando dosis diarias del fármaco, si bien, también se han descrito terapias diversas en las que se administran 5 dosis semanales respetando los fines de semana, **Ochiai**¹⁸⁸ y dosis de mantenimiento dos días por semana, **Buettemeyer**²⁴. En esta investigación, se ha decidido administrar dosis de 0.32 mg/Kg/día en terapia continua hasta el sacrificio de los animales, para asegurar niveles homogéneos del fármaco en plasma durante todo el periodo de estudio.

La duración del tratamiento en los distintos trabajos ha sido muy variable en función del objetivo a investigar, no obstante, autores como **Shibata**²²⁴, demuestran en investigaciones muy recientes la efectividad de la

terapia corta de 8 semanas con FK 506, que aplicada al aloinjerto de nervio periférico en ratas, permite que durante su administración proliferen nuevos capilares hacia el injerto provenientes del huésped, de tal forma que al suprimir el tratamiento inmunosupresor dicha vascularización se mantiene favoreciendo una adecuada regeneración axonal.

En la misma línea, **Hoto**¹⁰⁶, somete a ratas trasplantadas alogénicamente con nervio ciático, a una terapia con FK 506 de tan sólo 8 semanas, a dosis diarias intraperitoneales de 0,5 mg/Kg. El estudio que se realizó demostró una adecuada regeneración histológica y electrofisiológica a las 12 semanas de la cirugía, constatándose que terapias cortas con esta droga favorecen unas condiciones iniciales de inmunosupresión que permiten el inicio de la regeneración nerviosa, la cual se terminará de completar posteriormente a pesar de la supresión de dicho tratamiento y de la aparición consecuente de algunas fibras nerviosas degeneradas.

Con anterioridad, **Mackinnon**¹⁵⁸ estableció en ratas, a las que se realizó trasplante alogénico de nervio ciático, dos terapias inmunosupresoras con Azatioprina más corticoides, de corta y larga duración (30 y 100 días). En ambos casos se realizó estudio histológico a los 30, 100 y 180 días de realizada la cirugía. En el grupo control que no recibió tratamiento, a los 180 días se observó una muy pobre regeneración nerviosa con escasas fibras de mielina, degeneración Walleriana y fibrosis endo y perineural. Por el contrario, en los animales tratados, a los 30 días ya pudo detectarse regeneración nerviosa incipiente aun cuando las fibras no habían alcanzado el segmento distal del nervio. A los 100 y 180 días se detectó una adecuada regeneración histológica, incluso en los animales que sólo habían recibido una terapia corta de 30 días, no detectándose en ningún caso evidencia histológica de rechazo al no observarse infiltrado celular alrededor del injerto y al confirmarse la presencia de fibras bien recubiertas de mielina y células de Schwann de morfología normal.

Ishida¹¹⁴, demuestra que existe regeneración nerviosa incipiente a partir de las 3 semanas de realizar trasplante alogénico de ciático en ratones. A las 8 semanas, los grupos que recibieron tratamiento inmunosupresor con CyA y los que recibieron trasplante isogénico, presentaron una regeneración más avanzada, no pudiéndose observar diferencias significativas en la morfometría de ambos grupos, los cuales sí presentaron

una regeneración comparativamente mejor que la observada en el grupo de animales trasplantados alogénicamente sin inmunosupresor, siendo en este caso significativas las diferencias en el número total de fibras mielínicas observadas en los dos grupos de trasplante alogénico, con y sin tratamiento. **Schaller**²¹³, coincide en la observación de regeneración a partir de las 8-12 semanas en aloinjertos de ratas que fueron tratadas con CyA.

Como hemos visto, el concepto de terapia corta con inmunosupresor se encuentra alrededor de los 30-60 días, sin embargo, hay autores que establecen terapias aún más cortas, entorno a los 14 días con FK 506, **Kuroki**¹⁴³, al realizar trasplante alogénico de miembro inferior en ratas, que demuestra ser efectivo en cuanto a regeneración nerviosa al detectarse ésta a las 4 semanas de la cirugía, regeneración que como en otros casos se completa con posterioridad al ser invadido el injerto con las fibras nerviosas procedentes del huésped. En base a estas experiencias, en la presente investigación se ha optado por la terapia corta en la administración del inmunosupresor, estableciéndose dos tiempos de 5 y 11 semanas como promedio de los tiempos en que los estudios citados comienzan a objetivar, respectivamente, signos de regeneración incipiente y establecida.

3.- HALLAZGOS INMUNOLOGICOS. EVIDENCIA DE SUPRESION DEL RECHAZO POSTRASPLANTE.

Una vez superados los problemas técnicos en la realización del trasplante de nervio periférico, los primeros investigadores en este campo, **Barnes**¹¹, **Gutmann**⁹³, **Seddon**²¹⁷, tuvieron que enfrentarse a a serias complicaciones derivadas de la propia biología del alotrasplante, como son la degeneración Walleriana del injerto nervioso, su rechazo, reinervación y posterior remielinización de los nuevos axones desarrollados, con obtención de parámetros adecuados que permitieran una razonable recuperación funcional.

Sin embargo, hasta que no se ha profundizado en el aspecto inmunológico que describe el mecanismo de rechazo, no se ha producido un avance real en la obtención de trasplantes con éxito.

Das Gupta⁴³, centra sus investigaciones muy tempranamente en este aspecto estudiando nervios trasplantados alogénicamente a ratas. Macroscópicamente, no se observan cambios hasta el final de la primera semana en que el injerto aparece inflamado y adherido a los músculos adyacentes, situación que se acrecienta hasta la sexta semana en que apenas puede identificarse la fibra nerviosa la cual aparece sustituida casi por completo por tejido fibroso.

En la histología, el mismo autor observa en el injerto una progresiva migración celular de linfocitos provenientes del huésped, así como de células plasmáticas, que luego irán desapareciendo hasta el final de las 4 semanas cuando prolifera el tejido conjuntivo, y siguiendo el mismo patrón de crecimiento describe una leve proliferación de capilares hacia el injerto, que igualmente desaparecen luego a las 6 semanas. Paralelamente a la intensa reacción infamatoria descrita puede observarse una activa degeneración Walleriana.

Ambos procesos, constituyendo una fuerte reacción inmune, son considerados por el autor como posibles responsables de inhibir la naciente vascularización del injerto cuya supresión contribuye a la degeneración final del tejido. Esta observación concuerda con el resultado obtenido en la presente investigación, ya que las fibras nerviosas de los animales tratados, Figs. 26 y 30, con FK 506 presentan numerosos vasos que discurren paralelos a la dirección del nervio ciático, dato que no se observa en los animales no tratados, Fig. 25, lo cual indicaría que el tratamiento aplicado, FK 506 es capaz de inhibir la reacción inmune asociada al inicio del rechazo, y permitir así que en los animales tratados, prolifere la vascularización proveniente del huésped que nutrirá al tejido en regeneración.

En este aspecto, **Shibata**²²⁴ demuestra en un reciente estudio de trasplante nervioso animal tratado con FK 506, la importancia de preservar de este modo la mínima vascularización que pudiera tener el injerto alogénico, para que posteriormente nuevos capilares procedentes del huésped, logren alcanzar y progresar por el tejido trasplantado, dando lugar así a una adecuada vascularización que consigue mantenerse tras la supresión del inmunodepresor, esperando que con ello pueda obtenerse una adecuada regeneración axonal.

Por otro lado, en el presente estudio, la microscopía óptica convencional hace evidente también la conservación de la estructura histológica del nervio en los animales tratados, Fig. 47, el cual se mantiene en excelentes condiciones, aunque puede observarse alguna célula macrofágica y linfocitos en la perifería, próximos a los vasos sanguíneos del nervio. Por el contrario, las muestras de los animales no tratados, Fig. 46, además de presentar cierta desorganización en sus fibras nerviosas, contienen numerosas células macrofágicas entre los paquetes de las fibras mielínicas, así como acúmulos linfoides.

Häyry¹⁰⁰, muy posteriormente a **Das Gupta**⁴³, coincide en la misma línea científica admitiendo que histoincompatibilidad junto con una inmunosupresión inadecuada, inducen una respuesta inmune, que a su vez produce una reacción inflamatoria cuya intensidad afecta a la perfusión del tejido trasplantado, todo lo cual produce consecuentemente el inicio del rechazo agudo.

Esta revascularización inicial que se produce en el injerto nervioso tras su trasplante, según refiere **Grochowicz**⁸⁷, precede en varios días al inicio de la regeneración, y es condición previa indispensable para obtener una suficiente y adecuada proliferación de células de Schwann, disposición de mielina y proliferación axonal, que garanticen la regeneración tisular. El autor demuestra mediante angiografía de aloinjerto nervios en ratas, que la CyA es capaz de preservar el patrón vascular adecuado para permitir el inicio de la regeneración axonal, retrasando incluso la aparición del infiltrado linfocitario característico que acompaña al rechazo en su fase inicial, lo cual favorece aún más dicha regeneración.

Levinthal¹⁴⁷ demuestra que puede obtenerse alguna ventaja al trasplantar fascículos nerviosos en vez de un nervio completo. En su experiencia con ratas, se hace evidente que los fascículos trasplantados de forma alogénica producen menos rechazo, quizá debido a que éste es percibido por el huésped como menos antigénico que el nervio completo, aunque ambos, fascículo y nervio, muestran infiltración aguda perineural e interfascicular de linfocitos, dato observado también en los injertos nerviosos de la presente investigación, y posteriormente proliferación de tejido conjuntivo, con distinta intensidad para cada caso. En un segundo trasplante de idéntico donante, se produce una reacción de rechazo más

intensa debido a que ya existió una previa sensibilización al antígeno tisular del injerto, siendo ésta reacción mucho más lenta en el caso del trasplante fascicular puesto que la sensibilización inicial fué mucho menor.

En estudios más detallados, otros autores, **Comtet**³⁷, **Grochowicz**⁸⁸, distinguen entre los dos procesos inflamatorios que acontecen de forma simultánea tras la realización del trasplante nervioso en ratas y que son la degeneración Walleriana, en la que se observa un predominio de células macrofágicas y monocitos, y el inicio de la reacción de rechazo alogénico, que se caracteriza por la infiltración de células macrófagos-like y linfocitos T procedentes del huésped, así como por la expresión de antígenos tisulares de identidad Ia (que corresponden al CMH tipo II humano), en la célula de Schwann donante. Este último dato no se observa en el trasplante autólogo, lo que indica, como confirma **Anselin**⁷, que la célula de Schwann es capaz de activarse y actuar, en el aloinjerto, como célula presentadora de antígenos al huésped, y en el autoinjerto como célula con propiedades fagocíticas, que expresa marcadores de identidad propios de los monocitos y macrófagos. Por ello, esta célula ha sido considerada como célula diana en el inicio de la reacción de rechazo alogénico.

Lassner¹⁴⁶, en el curso de una reacción de rechazo también encuentra expresión de antígenos del CMH tipo II, en las fibras de mielina y endotelio vascular de un injerto nervioso alogénico de rata, coincidiendo con investigaciones previas, **Yu**²⁷⁷. Este hallazgo coincide plenamente con el obtenido en nuestro estudio, ya que en las muestras procedentes de los animales no sometidos a tratamiento inmunosupresor, Fig. 44, se observan numerosas células dispersas por el propio nervio ciático como asociadas o rodeando a los puntos de sutura, expresando éste antígeno clase II del CMH, y que podrían identificarse como células de Schwann. En relación a esto, no se observaron diferencias significativas entre el marcaje observado a las 5 y 11 semanas.

Por el contrario, en las muestras procedentes de los animales tratados con FK 506 la reacción de marcaje de este antígeno clase II aparece mucho más débil que en las muestras control, Fig. 45. Esto indica que la acción del fármaco consigue mantener una inmunosupresión adecuada que impide o al menos disminuye la expresión de estos antígenos, expresión que parece relacionarse, según refieren otros autores, **Lassner**¹⁴⁶, **Anselin**⁷ con el

desencadenamiento de la reacción de rechazo, al actuar así éstas células como células presentadoras de antígenos frente a la inmunidad del huésped. Los mismos autores demuestran en sus investigaciones que el rechazo observado se dirige al endotelio vascular y a la mielina de las células de Schwann del injerto.

Lassner¹⁴⁶ prosigue en su estudio sugiriendo que el rechazo elimina las células de Schwann donantes pero no destruye la arquitectura del nervio, permitiendo de este modo que se produzca un cierto grado de regeneración a partir de ese soporte acelular en que queda convertido el injerto tras la reacción de rechazo. Esta regeneración a la que el autor alude también es observada por **Schaller**²¹³, en aloinjertos nerviosos de ratas, donde refiere hallar fibras regeneradas inmersas en grandes zonas de degeneración del nervio trasplantado al cual no se administró tratamiento inmunosupresor.

Por el contrario, estos hallazgos no coinciden con lo observado por otros autores, **Gulati**⁸⁹, ya que en el trasplante alogénico no tratado no se observan signos de regeneración una vez rechazado el injerto. Esto podría deberse a que una histoincompatibilidad parcial puede dar lugar a una reacción de rechazo incompleta y prolongada, lo cual anularía la posibilidad de que se inicie la regeneración nerviosa, que por el contrario se facilita cuanto más intenso y agudo sea el rechazo, según los hallazgos referidos por **Lassner**¹⁴⁶.

Otros autores como **Zalewski**²⁷⁹ explican esta ausencia de regeneración en el alotrasplante nervioso no tratado, al no suturar el extremo distal del injerto, lo que impediría que los factores neurotróficos procedentes del tejido nervioso del receptor, ejercieran su influencia regeneradora sobre el aloinjerto.

Pollard y Fitzpatrik²⁰¹, en 1973, describen la reacción de rechazo del aloinjerto como una respuesta inmunológica importante en la que predomina la invasión de linfocitos y macrófagos, y en la que destaca el papel de la célula de Schwann como célula no pasiva que adquiere un importante papel en relación al inicio de la respuesta inmune.

Estudios recientes, confirman estas observaciones, y así, **Ansselin**⁷, estudia la inmunidad que se produce entre dos cepas de ratas no

compatibles histológicamente a las que realiza un trasplante alogénico de nervio periférico, cuantificando posteriormente el número de linfocitos T helper (T4) y T citotóxicos (T8), así como el número de macrófagos y la secuencia de aparición de los mismos durante los días 1 al 14 siguientes a la realización del trasplante. Igualmente, estudia la expresión en el injerto, de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II.

Los resultados que obtiene demuestran un aumento progresivo de linfocitos T4 y T8 a partir del día 2 postrasplante, destacando en este incremento un predominio de linfocitos T8, que alcanzan su máximo hacia el día 6-7, momento éste que se hace coincidente con el punto álgido del rechazo agudo, donde el injerto muestra signos de severa inflamación y la arquitectura del nervio se ve afectada por dicha invasión celular, que por el contrario no aparece en los casos control de trasplante autólogo.

A partir del día 10, el número de linfocitos T4 y T8 disminuye progresivamente, siendo más notable el descenso de los linfocitos T8. El día 14 el aloinjerto se muestra como un conjunto de axones y células de Schwann en degeneración con algún acúmulo de linfocitos entre ellas, pudiéndose observar el injerto, hacia el día 21 postrasplante, como un tejido fibrótico invadido por fibroblastos, con signos incipientes de regeneración axonal y ya sin la presencia de linfocitos.

Este autor, refiere en su investigación el claro predominio de acúmulo celular linfocitario, tanto en los alrededores de las líneas de sutura del injerto como en las proximidades de los vasos sanguíneos, lo cual sugiere que la diseminación celular de linfocitos llega al tejido trasplantado desde el torrente sanguíneo, como refieren también otros autores, **Grochowicz**⁸⁷, **Hall**⁹⁴.

En este aspecto, y en el estudio que presentamos, la reacción de inmunomarcaje contra timocitos y población global de células T (CD5), reveló en las ratas control una reacción positiva en algunas células linfoides en el interior del nervio ciático y asociadas a la perifería del mismo y a los puntos de sutura, en la zona medial del nervio tanto en los animales de 5 semanas, como de 11 semanas. Por el contrario, en los nervios procedentes de los animales sometidos a tratamiento con FK 506 durante los mismos tiempos, la reacción inmunohistoquímica contra timocitos y células T, es

marcadamente más débil, localizándose en la envuelta conjuntiva que se halla rodeando al nervio y en algunas células periféricas al propio nervio, Fig. 33.

Por todo ello, puede deducirse que en este estudio, los animales tratados con FK 506 presentan una menor infiltración de timocitos y células T periféricas, que son las responsables del inicio de la reacción de rechazo una vez presentados los antígenos de identidad del aloinjerto nervioso.

Siguiendo la línea de otros autores, **Anselin**⁷ y **Lassner**¹⁴⁶, **Levinthal**¹⁴⁷ y otros, que realizan sendos experimentos trasplantando nervio periférico a cepas distintas de ratas, en el estudio que presentamos se han obtenido similares resultados al cuantificar la subpoblación de células T helper (CD4), tanto en animales control como tratados. En los primeros, Fig. 38, el marcaje inmunohistoquímico contra el anticuerpo, ha demostrado una positividad claramente más fuerte, asociada a la periferia de los puntos de sutura, y al interior del nervio ciático, en relación a la proximidad de los vasos y no se han hallado diferencias en relación a los tiempos de tratamiento. De forma opuesta, el marcaje para estas células en las ratas que recibieron FK 506 se observó en la misma localización aunque notablemente más débil, Fig. 39, destacando en estos animales respecto al grupo control, que la positividad de la reacción se debilita aún más cuando se prolonga el tratamiento hasta 11 semanas, lo cual permite deducir que en los animales tratados con este inmunosupresor, la reacción de rechazo postinjerto puede controlarse mejor que en los animales no tratados.

Existe un paralelismo en la cuantificación de otra subpoblación de linfocitos, linfocitos T citotóxicos (CD8), que de forma idéntica a los resultados obtenidos por los autores mencionados y junto a la mayor parte de células Natural Killer (NK) y leucocitos granulares intraepiteliales que intervienen en la reacción de rechazo tras ser estimulada su producción por los linfocitos T helper, dan una reacción fuertemente positiva en la proximidad de los puntos de sutura e interior del nervio ciático en los animales que no recibieron tratamiento inmunosupresor, Fig. 34, no así en los animales tratados, Fig. 36, que además de presentar una reacción mucho más débil para éstas subpoblaciones celulares, aquélla va perdiendo intensidad en relación a la duración del tratamiento, por lo que, al igual que para la población global de linfocitos, podemos deducir que tanto la

subpoblación de linfocitos T helper, como T citotóxicos, células NK y leucocitos granulares intraepiteliales, responsables inmediatos de que se produzca el inicio y mantenimiento de la reacción de rechazo, se hallan presentes de forma marcadamente más intensa en los animales no tratados, Fig. 35, no hallándose diferencias en los distintos tiempos analizados, y por el contrario, disminuyen de forma notable y progresivamente más en la medida en que se prolonga el mantenimiento del tratamiento inmunosupresor, en las ratas tratadas con FK 506, Fig. 37.

La experimentación de autores como **Ishida**¹¹³, que trasplantan injerto nervioso alogénico en ratones y estudia tanto la inmunidad celular como humoral en la fase de rechazo, pone en evidencia el incremento de macrófagos que se produce en el contexto inmunológico en cascada, desencadenado al activarse los linfocitos T helper. **Comtet**³⁷, también en ratones, observa un infiltrado mononuclear y de células con actividad macrofágica desde los días 6 al 15 del estudio realizado, mencionando que éste se produce no tanto en las proximidades de los vasos sino en el epineuro del tejido. En este punto, **Anselin**⁷ coincide en que el incremento de estas células se produce desde el día 4 al 10, y unos 3 días con retraso al punto máximo de producción de los linfocitos T4 y T8 y coincide igualmente en la localización de linfocitos en las proximidades de suturas y vasos sanguíneos y de macrófagos alrededor de axones y células de Schwann.

En el presente estudio, la utilización de anticuerpos capaces de reconocer tanto macrófagos como granulocitos y una población de células dendríticas, ha permitido objetivar su presencia de forma intensa en los animales control, Fig. 40 y claramente más débil en los tratados, Fig. 41. Sin embargo, en estos hallazgos, las células se encuentran tanto inmersas en el propio tejido nervioso como en las proximidades de los vasos, lo que indica que la reacción de rechazo, se produce a expensas no sólo de las células macrofágicas del tejido nervioso propiamente dicho, sino también de los macrófagos circulantes o monocitos sanguíneos, por lo que éstas células pueden localizarse también en las proximidades de los vasos sin alterar los resultados.

Anselin⁷, describe en su experiencia el predominio de macrófagos, una vez comenzado el descenso de linfocitos en el tejido trasplantado durante la reacción de rechazo, dato que coincide plenamente con los

resultados obtenidos, donde aún siendo menor el marcaje para éstas células en los animales tratados, no se aprecian diferencias en la proporción de macrófagos a las 5 y 11 semanas, en contraste con el marcaje de linfocitos que claramente disminuye en los dos tiempos. Estos hallazgos sugieren que FK 506 respecto a los grupos control, hace disminuir el número de linfocitos y macrófagos, conservando, aunque de forma numéricamente menor, el patrón de rechazo donde se produce un incremento inicial de ambos grupos celulares y posterior descenso, principalmente de los linfocitos, mientras predominan casi invariablemente los macrófagos iniciando posteriormente un lento declinar en su número.

En relación al marcaje del CMH-I en el aloinjerto, diferentes estudios, **Hall**⁹⁴, **Yu**²⁷⁷, **Anselin**⁷, coinciden en hallar un incremento de este marcador antigénico de identidad tisular, que se halla presente en todos los tejidos, y cuyo aumento es paralelo al incremento de linfocitos T8 que son los que reconocen dicho antígeno.

En coincidencia con estos hallazgos, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran igualmente una reacción inmunohistoquímica fuertemente positiva para el marcador de este antígeno en las ratas control, Fig. 42, y algo más débil en los animales tratados, Fig. 43, guardando una proporción similar al número de linfocitos T8 hallados en ambos grupos, y siendo la distribución no sólo asociada a los puntos de sutura sino también formando un entramado de naturaleza reticular en el interior de las secciones transversales del nervio ciático, como correspondería a cualquier marcador de identidad tisular, y en este caso no en las proximidades de los vasos por el mismo motivo. Por todo ello, podemos deducir que el inmunosupresor FK 506, al disminuir la reacción inmune de rechazo hace que sea menor el número de linfocitos T8 que puedan reconocer el antígeno de identidad del tejido trasplantado, por lo que es de esperar que la reacción contra el mismo esté muy disminuida en relación al grupo no tratado.

De la observación de los datos electrofisiológicos se desprende que el grupo de ratas control las primeras dos semanas no alcanzó más que un promedio de respuesta del 63.06% (r=60-152). Sin embargo a las 3 semanas ya se alcanza una media próxima al 100% de respuesta que se mantiene durante todos los períodos estudiados.

Ambos grupos de ratas estudiadas, tratadas y no tratadas con FK-506, siguieron un camino paralelo en cuanto a la respuesta contráctil, siempre en el entorno del 100%. Llama la atención como a las 10 semanas en ambos grupos se precisa aumentar el estímulo para alcanzar la respuesta normal.

V.-CONCLUSIONES

1.- FK506 es capaz de inhibir la reacción inflamatoria asociada al inicio del rechazo favoreciendo que en el grupo de animales tratados, prolifere la vascularización y se produzca una mayor supervivencia del injerto.

2.- Se ha observado una clara diferencia en la conservación de la estructura del nervio a nivel histológico, que se mantiene en excelentes condiciones en los animales inmunodeprimidos, en oposición al grupo control donde las fibras se hallan desgajadas.

3.- En el análisis inmunohistoquímico del alotrasplante nervioso, los animales no tratados presentan una marcada positividad para células relacionadas con el inicio del rechazo: macrófagos, linfocitos T y Ag de identidad Ia.

4.- El marcaje para linfocitos CD8, responsables del mantenimiento del rechazo, da una reacción inmunohistoquímica muy positiva en el grupo control tanto a las 5 como a las 11 semanas, objetivándose por el contrario un marcaje progresivamente más débil en los animales tratados a medida que se prolonga la duración del tratamiento.

5.- No se han hallado diferencias importantes en la infiltración celular, salvo para linfocitos CD8, a las 5 y 11 semanas de realizado el aloinjerto, tanto en el grupo control como en el que recibió tratamiento.

6.- Se ha observado una mayor velocidad de conducción motora estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a las 11 semanas en los animales inmunodeprimidos con FK506, respecto a aquellos que no se trataron.

7.- La amplitud de potencial de acción muscular registrada en el grupo de alotrasplante tratado presenta una diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0.001$), respecto al grupo control.

8.- En el análisis de imagen realizado en alotrasplante nervioso de animales tratados y control, se ha detectado una mayor densidad de axones en el grupo que recibió tratamiento con FK 506.

9.- Puede deducirse de las anteriores conclusiones que FK 506 es un fármaco inmunosupresor que a bajas dosis, sin evidencia de efectos secundarios importantes, es capaz de inhibir la reacción de rechazo del aloinjerto nervioso en ratas, permitiendo una adecuada regeneración y recuperación funcional de la fibra nerviosa.

1. **Abu-Elmagd KM, Bronsther O, Kobayashi M.** Acute hemolytic anaemia in liver and bone marrow transplant patients under FK 506 therapy. *Transplant Proc* 3: 3190-3192, 1991.
2. **Adarsh K, Gulati PhD, Geoffrey, P.** Nerve graft immunogenicity as factor determining axonal regeneration in the rat. *J Neurosurg* 72: 114-122, 1990.
3. **Adson HM, Van Beek AM, Smith DO.** Generation of nerve length with tissue expander. *42nd Ann Meeting Am Soc for Surg of the Hand.* San Antonio, Sept. 9-12, 1987.
4. **Afanasieff A.** Premiers resultats de 20 homogreffes de nerfs conserves par le cialit. *Pres Med* 27: 1409, 1977.
5. **Almquist E.** Nerve repair by laser. *Orthop Clin North Am* 19: 201, 1988.
6. **Andersson J, Nags S, Groth G.** Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 75: 136-142, 1992.
7. **Anselin AD, Pollard JD.** Immunopathological factors in peripheral nerve allograftrejection: quantification of lymphocyte invasion and major histocompatibility complex expression. *J Neurol Sci* 96: 75-88, 1990.
8. **Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H.** *Implante de órganos.* Ed. Garsi. Madrid, 1988.
9. **Banerji SS, Parsons JN, Tocci MJ.** The immunosuppressant FK506 specifically inhibits mitogen-induced activation of the interleukin-2 promoter and the isolated enhancer elements NFIL-2A and NF-AT1. *Mol Cell Biol* 11: 4074-4087, 1991.
10. **Barclay AN.** The localisation of populations of lymphocyte defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissue. *Immunology* 42: 593-600, 1981.
11. **Barnes R, Bacsich P, Wyburn M.** A study of the fate of nerve homografts in man. *Br J Surg* 34: 34, 1946.

12. **Baschong W.** Reversible fixation for the study of morphology and macromolecular composition of fragile biological structures. *Eur J Cell Biol* 32: 1-6, 1983.
13. **Baumman G, Geisse S, Sullivan M.** Cyclosporin A and FK506 both affect DNA binding of regulatory nuclear proteins to the human interleukin-2 promoter. *New Biology* 3: 270-278, 1991.
14. **Beck Y, Akiyama N.** Effect of FK506 and cyclosporine on human lymphocyte response in vitro. *Transplant Proc* 21: 3464-3467, 1989.
15. **Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF.** Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9231-9235, 1990.
16. **Bierer B, Schreiber SL, Burakoff SJ.** The effect of the immunosuppressant FK506 on alternate pathways of T-cell activation. *Eur J Immunol* 21: 439-445, 1991.
17. **Bierer BE, Schreiber SL, Burakoff SJ.** Mechanism of immunosuppression by FK-506. Preservation of T-cell transmembrane signal transduction. *Transplantation* 49: 1168-1170, 1990.
18. **Böhler J.** Paper held at the Xth Congr. SICOT, Paris, September 6-9, 1966.
19. **Bora W.** Peripheral nerve repair in cats. *J Bone Joint Surg* 49-A: 659, 1967.
20. **Brabletz T, Pietrowski I, Serfling E.** The immunosuppressives FK506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the 2 purine boxes of the interleukin-2 enhancer. *Nucleic Acids Res* 19: 61-67, 1991.
21. **Bradley WG, Asbury AK.** Duration of synthesis phase in neurilemma cells in mouse sciatic nerve during degeneration. *Expl Neurol* 26: 275-282, 1970.

22. **Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR.** Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 10: 609-615, 1980.
23. **Büettemeyer R, Jones NF, Rao UN.** Peripheral nerve allotransplant immunosuppressed with FK 506: Preliminary results. *Transplant Proc* 27, N° 2: 1877-1878, 1995.
24. **Büettemeyer R, Rao U, Jones NF.** Peripheral nerve allograft transplantation with FK 506: functional, histological, and immunological results before and after discontinuation of immunosuppression. *Ann Plast Surg* 35 (4): 396-401, 1995.
25. **Cajal S.R.** Degeneration and regeneration of the nervous system. R.M. May (Trans. Ed.), New York, Hafner Publishing Co. Vol. 1, 361. 1928.
26. **Cajal S.R.** Mecanismo de la regeneración y degeneración de nervios. *Trab Lab Invest Biol Madrid* 4: 119, 1905.
27. **Calne R.Y.** The present status of liver transplantation. *Transplant Proc* 9: 209, 1977.
28. **Calne RY.** Organ transplantation with special emphasis on cyclosporin A. *Jpn J Surg* 14: 435, 1984.
29. **Campbell JB, Basset AL, Husby J, Thulin C, Feringa, E.** Microfilter sheathing in peripheral nerve surgery. *J Trauma* I: 139, 1971.
30. **Cantrell DA, Robins RA, Brooks CG.** Phenotype of rat natural killer cells defined by monoclonal antibodies marking rat lymphocyte subsets. *Immunology* 45: 97-103, 1982.
31. **Carrol PB, Rilo H, Reyes J.** FK 506 associated diabetes mellitus in the pediatric transplant population is a rare complication. *Transplant Proc* 3171-3172, 1991.
32. **Cheon SK, Mickem K, Mason DY.** Computerised image hedling in pathology. *J Clin Pathol* 48:796-804, 1995.

33. **Chiu D.** Application of autogenous venous conduit for management of palmar cutaneous nerve neuroma. *Symposium Peripheral Nerve Surgery Today* Vienna 23-26, November, 1991.
34. **Christians U, Braun F, Kosian N.** Highperformance liquid chromatography /mass spectrometry of FK-506 and its metabolites in blood, bile and urine of liver grafted patients. *Transplant Proc* 23: 2741-2744, 1991.
35. **Christians U, Kruse C, Kownatzki R.** Measurement of FK-506 by HPLC and isolation and characterization of its metabolites. *Transplant Proc* 23: 940-941, 1991.
36. **Collier D, Calne, RY, Thiru S.** FK 506 in experimental renal allografts in dogs and primates. *Transplant Proc* 20: 226, 1988.
37. **Comtet JJ, Revilland, JP.** Peripheral nerve allografts. Distinctive histological features of nerve degeneration and immunological rejection. *Transplantation* 28 (2) 103-106, 1979.
38. **Cuello AC, Milstein C, Couture R.** Characterization and immunocytochemical application of monoclonal antibodies against enkephalins. *J Histochem Cytochem* 32: 947-957, 1984.
39. **Curtis JW, Eversman WW.** Internal neurolysis as an adjunct in the treatment of carpal tunnel syndrome. *J Bone Joint Surg* 55-A: 733, 1973.
40. **Dallman MJ, Masn DW, Webb M.** The roles of host and donor cells in the rejection of skin allografts by T cell-deprived rats injected with syngenic T cells. *Eur J Immunol* 12: 511-518, 1982.
41. **Dallman MJ, Thomas ML Green JR.** MRC OX-19: a monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses. *Eur J Immunol* 14: 206-207, 1984.
42. **Darras FS, Jordan ML, Shapiro R.** Transplantation of pediatric en bloc kidneys under FK 506 immunosuppression. *Transplant Proc* 23: 3089-3090, 1991.

43. **Das Gupta T.** Mechanism of rejection of peripheral nerve allografts. *Surg Gynecol Obstst* Nov: 1058-1065, 1967.
44. **Dausset J.** Iso-leuco-anticorps. *Arch Haematol* 20: 156, 1958.
45. **De Franco AL.** Inmunosuppressants at work. *Nature* 352: 754-755, 1991.
46. **Dellon A.** Wound healing in nerve. *Clin Plast Surg* Vol. 17, N°3: 545-570, 1990.
47. **Dellon E, Lee A.** The first nerve graft, Vulpian, and the nineteenth century neural regeneration controversy. *J Hand Surg* 18A: 369-372, 1993.
48. **Demetris AJ, Fung JJ, Todo S, Mc Cauley J.** Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK506 immunosuppressive therapy-a clinicopathologic study in 96 patients. *Transplantation* 53: 1056-1062, 1992.
49. **Demetris AJ, Banner B, Fung J, Shapiro R.** Histopathology of human renal allograft rejection under FK 506: a comparison with cyclosporine. *Transplant Proc* 23: 944- 946, 1991.
50. **De Paulis A, Cirillo R, Ciccarelli A.** Characterization of the anti-inflammatory effect of FK50 on human mast cells. *J Immunol* 147: 4278-4285, 1991.
51. **De Paulis A, Stellato C, Cirillo R.** Anti-inflammatory effect of FK506 on human skin mast cells. *J Invest Dermatol*. 99: 723-728, 1992.
52. **De Pedro JA, Fonseca RG, Navarrete FG, Martinez A, Alsasua A, Sanz J y Duran LL.** Regeneración nerviosa experimental en alotrasplantes de rata. II Congreso de la SEEA. Libro de Actas. León. 1989.
53. **De Pedro JA, Gutierrez-Fonseca R, Garcia-Muela D, Gomez-Castresana F, Garcia de Lucas F, Tome JL, Lopez-Duran L, Alsasua A, De Lorenzo P, Martinez A y Sanz j.** Trasplante experimental de nervios periféricos. *Trib Méd.* 1990, 63: 20-21.

54. De Pedro JA, Gutierrez-Fonseca RG, Garcia Muela D, Gomez-Castresana F, Garcia de Lucas F, Tome JL, Martinez A, Alasua A, Sanz J, De Lorenzo P, Lopez-Duran L.: Trasplante experimental de nervios periféricos: I.- Evaluación de la criopreservación. *Rev Ortop Trauma* 1991, 35: 334-339.
55. Diethelm A.G. A critical appraisal of renal transplantation. *Transplant Proc* 24: 2387-2390, 1992.
56. Ducker TB, Hayes G. Experimental improvements on the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. *J Neurosurg* 28: 582, 1978.
57. Dumont FJ, Altmeyer A. Differential modulation of IL-1 induced IFN-g production by the immunosuppressive macrolides rapamycin (RAP) and FK506. *Lymphokine Research* 9: 574, 1990.
58. Durán Sacristán H, Imaz I, Martín L. Trasplante de órganos y tejidos. *Tratado de patología y clínica quirúrgicas*. Vol. 1: 570-607, 2º Ed, 1992.
59. Edshage S. Peripheral nerve sture. *Acta Chir Scand Suppl* 33: 1, 1962.
60. Eidelman B, Abu-Elmagd K, Wilson J. Neurologic complications of FK 506. *Transplant Proc* 23: 3175-3178, 1991.
61. Eiras G, Shimizu Y van Seventer GA. Effects of FK506 and cyclosporine on T-cell activation: integrin-mediated adhesion of T-cells, proliferation, and maturation of cytotoxic T-cells. *Transplant Proc* 23: 936-939, 1991.
62. Ericzon BG, Wijnen RMH, Tiebosch A. The effects of FK506 treatment on pancreaticoduodenal allotransplantation in the primate. *Transplantation* 53: 1184-1189, 1992.
63. Erler BS, Chein K, Marchevsky AM. An image analysis workstation for the pathology laboratory. *Mod Pathol* 6(5):612-618, 1993.

64. **Esquivel CO, Egawa H, Cox K.** Experiences with FK506 conversion therapy in pediatric liver transplantation (OLT). Abstract. Presented at *The American Society of Transplant Physicians 12th Annual Meeting*, Houston, Texas, May, 1993.
65. **European FK 506 Study Group.** A European multicentre randomized study to compare the efficacy and safety of FK506 with that of cyclosporine in patients undergoing primary liver transplantation. Abstract. Presented at *The American Society of Transplant Surgeons 19th Annual Scientific Meeting*. Houston, Texas, May, 1993.
66. **Fabrega AJ, Blanchard JM, Brauncher E.** FK 506 enhances the beneficial effects of donor-specific blood transfusion on allograft survival in rats. *Transplant Proc* 23: 3312-3313, 1991.
67. **Farreras P, Rozman C.** *Medicina Interna*. Ed. Doyma. 12° Ed. 2641-2647, 1992.
68. **Faulds D, Goa KL, Benfield P.** Cyclosporin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45: 953-1040, 1993.
69. **Fidelus RK, Laughter AH.** Protein kinase activation and the immunosuppressant cyclosporine. *Transplantation* 41: 187-192, 1986.
70. **Flannagan WF, Corthesy B, Bram RJ.** Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK506 and cyclosporin A. *Nature* 352: 803-807, 1991.
71. **Forman D, Wood D, Desilva S.** The rate of regeneration of sensory axons in transected rat sciatic nerve repaired with epineural sutures. *J Neurol Sci* 44: 55-59, 1979.
72. **Forrest MJ, Jewell ME, Koo GC.** FK506 and cyclosporin: selective inhibition of calcium ionophore induced polymorphonuclear leukocyte degranulation. *Biochem Pharmacol* 42: 1221-1228, 1991.

73. **Fruman DA, Klee CB Bierer BE.** Calcineurin phosphatase activity in T-lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3686-3690, 1992.
74. **Fukumoto T, McMaster WR, Williams AF.** Mouse monoclonal antibodies against rat major histocompatibility antigens. Two Ia antigens and expression of Ia and class I antigens in rat thymus. *Eur J Immunol* 12: 237-243, 1982.
75. **Fung J, Abu-Elmagd K, Jai A.** A randomised trial of primary liver transplantation under immunosuppression with FK 506 vs cyclosporine. *Transplant Proc* 23: 2977-2983, 1991.
76. **Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K.** Adverse effects associated with the use of FK506. *Transplant Proc* 23: 3105-3108, 1991.
77. **Fung JJ, Todo S, Tzakis A.** Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK506- based immunosuppression: benefits and pitfalls. *Transplant Proc* 23: 14-21, 1991.
78. **Gabrielson GS, Stentoem S.** A contribution of peripheral nerve suture. *Plast Reconstr Surg* 8: 68, 1966.
79. **Gallyas F.** Physico-chemical mechanism of the argyrophil III reaction. *Histochemistry* 74: 409-421, 1982.
80. **Glasby M, Gechmeissner S, Huang C, Desouzar B.** Degenerated muscle grafts used for peripheral nerve repairing primates. *J Hand Surg (Br.)*, 11: 347-351, 1986.
81. **Gordon RD, Todo S, Tzakis AG.** Liver transplantation under cyclosporins: a decade of experience. *Transplant Proc* 23: 1393-1396, 1991.
82. **Goto T, Kino T, Hatanaka H.** Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplantation Proc* 19, N° 5, suppl 6: 4-8, 1987.

83. **Gotoh M, Fukuzaki T, Dono K.** FK506 and islet transplantation: a potential protocol for inducing tolerance. *Diabetes Nutrition and Metabolism* 5 (suppl 1): 125-128, 1992.
84. **Gotoh M, Mondem M., Kanai T.** Tolerance induction by liver grafting and FK506 treatment in nonhuman primates. *Transplant Proc* 23: 3265-3268, 1991.
85. **Grabb WC, Spencer LB, Koepke GH, Green RA.** Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. *Plast Reconstr Surg* 46: 31, 1970.
86. **Griffin AD, Hawthorne WJ, Inutsuka S.** FK506 in canine renal transplantation. *Transplant Proc* 24: 2305-2306, 1992.
87. **Grochowicz P, Hettlage R, Schatzl M.** Immunosuppression in nerve allografting: analysis of revascularization and cellular infiltrates. *Transplant Proc* 17 (1): 675-677, 1985.
88. **Grochowicz P, Romaniuk A.** Rejection pattern of nerve allografts—changes in graft and host cell determinants. *Transplant Proc* 16 (1): 1131-1132, 1987.
89. **Gulati AK.** Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg* 68: 117, 1988.
90. **Gutierrez-Fonseca R, De Pedro JA, Cuadrado MA, Garcia De Lucas FG, Tome JL, Alasua A, Lopez-Duran L y Lorenzo P.** Evaluación del Frío y la Ciclosporina A en los homoinjertos nerviosos. *Arch Fac Med Zaragoza*. 1988, 28: 177.
91. **Gutierrez-Fonseca R, De Pedro JA, Martinez A, Martinez Lopez PA, Alasua A y Lopez-Duran L.** Efecto de la criopreservación sobre los aloinjertos de nervios en ratas. VI Cong. SEIQ. Libro de Resúmenes, 1990: 87-88.

92. **Gutierrez fonseca r, de pedro ja, martinez a, lopez a, alsasua a and lopez-duran l.** Effects of cryopreservation upon nerve allografts in rats. *Res Surg* 3: 113, 1991.
93. **Guttman E, Guttman L.** Effect of electrotherapy on denervated muscle in rabbits. *Lancet* a; i: 169-17, 1942.
94. **Hall B.M.** Cellular infiltrates in allografts. *Transplant Proc.* 19 (1): 50-56, 1987.
95. **Hamilton PW and Allen DC.** Morphometry in histopathology. *J Pathol* 175:369-379,1995.
96. **Hanke JH, Nichols LN, Coon ME.** FK506 and rapamycin selectively enhance degradation of IL-2 and GM-CSF mRNA. *Lymphoquine Cytokine Res* 11: 221-231.
97. **Hart DNJ, Fabe JW.** MHC antigens in rat kidney, ureter and bladder; localisation with monoclonal antibodies and demonstration of Ia positive dendritic cells. *Transplantation* 318-325, 1981.
98. **Hart DNJ, Fabe JW.** Problems in the use of erythrocytes in RT1A typing studies probably due to quantitative differences in the expression of RT1A antigens in different strains. *Transplant Proc* 13: 1329-1322, 1981.
99. **Hatazawa C, Yamaguchi M, Kato T.** Effect of FK506 on bowel transplantation in rats. *Transplant Proc* 24: 1172, 1992.
100. **Häyry P, Alatalo S.** Cellular and molecular biology of chronic rejection. *Transplant Proc* 27 (1): 71-74, 1995.
101. **Heitman J, Movva NR.** Proline isomerases at the crossroads of protein folding, signal transduction and immunosuppression. *New Biol* 4 (5): 448-460, 1992.

102. **Henderson DJ, Nya I, Bundick RV.** Comparison of the effects of FK506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production. *Immunology* 73: 316-321, 1991.
103. **Hildebrandt A, Meisner B, Human P.** FK506: short- and long-term treatment after cardiac transplantation in nonhuman primates. *Transplant Proc* 23: 509-510, 1991.
104. **Hirai T, Waddell TK, Puskas JD.** Prolonged lung allograft survival with a short course of FK 506. *J Thorac Carciovasc Surg* 105: 1-8, 1993.
105. **Hirao A, Kawano Y, Takaue Y.** Effects of immunosuppressants, FK506, deoxyspergualin, and cyclosporine A on immature human hematopoiesis. *Blood* 81: 1179-1183, 1993.
106. **Hoto T.** Histological and electrophysiological studies of peripheral nerve allografts using immunosuppressive agent. *J Kyoto Prefect Univ Med* 103, N° 11: 1259-1271, 1994.
107. **Hubbel WL, Mc Connell H.M.** Spin-Label studies of the excitable membranes of nerve and muscle. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 61: 12-16, 1978.
108. **Hultsch T, Alwers MW, Schreiber SL.** Immunophilin ligands demonstrate common features of signal transduction leading to exocytosis or transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6229- 6233, 1991
109. **Ikeda K.** Cultured Schwann cells transplanted between nerve gaps promote nerve regeneration. *Neuro-Orthopedics* 11: 7-16, 1991.
110. **Inamura N, Nakahara K, Kino T.** Prolongation of skin allograft survival in rats by a novel immunosuppressive agent, FK 506. *Transplantation* 45: 206, 1988.
111. **Irisarri C.** Cirugía de los nervios periféricos. *Tiempos Médicos* 480: 21-33, 1993.
112. **Isai H, Painter DM, Sheil AGR.** FK506 and orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 22 (5): 2125-2126, 1990.

113. **Ishida O, Ochi M, Ikuta Y.** Peripheral nerve allograft: cellular and humoral immune response of mice. *J Surg Resch* 49: 233-238, 1990.
114. **Ishida O, Ochi M, Miyamoto Y.** Suppression by cyclosporine of cellular and humoral reactivity after peripheral nerve allografts in mice. *Transplantation* 48 (5): 824-828, 1989.
115. **Jabaley M, Wallace W, Heckler F.** Internal topography of major nerves of the forearm and hand: a current view. *J Hand Surg* 5: 1-18, 1980.
116. **Jacobson JH, Suárez EL.** Microsurgery in the anastomosis of small vessels. *Surg Forum* 11: 767, 1960.
117. **Jain AB, Abu-Elmagd K.** Pharmacokinetics of FK-506 in liver transplant recipients after continuous intravenous infusion. *J Clin Pharmacol* 33: 606-611, 1993.
118. **Japanese FK-506 Study Group:** Japanese study of FK-506 on kidney transplantation: the benefit of monitoring the whole blood FK-506 concentration. *Transplant Proc* 23: 3085-3088, 1991.
119. **Japanese FK 506 Study Group:** Japanese study of FK 506 on kidney transplantation: results of an late phase II study. *Transplant Proc* 25: 649-654, 1993.
120. **Japanese FK 506 Study Group:** Morphological characteristics of renal allografts showing renal dysfunction under FK 506 therapy: is graft biopsy available to reveal the morphological findings corresponding with FK 506 nephropathy. *Transplant Proc.* 25: 624-627, 1993.
121. **Jensen CWB, Jordan ML, Schneck FX.** Pediatric renal transplantation under FK 506 immunosuppression. *Transplant Proc* 23: 3075-3077, 1991.
122. **Jerecevic Z, Wiese B, Bryan J, Smith LC.** Validation of an imaging system: steps to evaluate and validate a microscope imaging system for quantitative studies. In :Methods in cell biology. Taylor DL, Wang Y (Eds). Academic Press Inc. Toronto pp:47-83,1989.

123. **Jiang H, Suguu H, Takahara S, Tanako Y.** Combined immunosuppressive effect of FK506 and other immunosuppressive agents on PHA-andCD3-stimulated human lymphocyte proliferation in vitro. *Transplant Proc* 23: 2933-2936, 1991.
124. **Johnson PC, Douglas R, Fung J.** Cyclosporin A and FK506: effects on platelet function. Abstract. *Clin Res* 38: 548A, 1990.
125. **Jones T, Mills S.** Total synthesis of the immunosuppressant FK-506. *J Am Chem Soc.* 111 N° 3: 1157-1159, 1987.
126. **Jordan ML, Hignet S, Wright J.** Inhibition of T-cell function by FK-506 and cyclosporine immunosuppression. *Transplant Proc.* 23: 2950-2952, 1991.
127. **Karnowsky MJ.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cel Biol* 27:137-138, 1965.
128. **Katayama Y, Takao M, Onoda K.** Immunosuppressive effects of FK506 and 15- deoxyspergualin in rat lung transplantation. *Transplant Proc* 23 : 349-353, 1991.
129. **Kay JE, Benzie CR.** Tlymphocyte activation through the D28 pathways is insensitive to inhibition by the immunosuppressive drug FK506. *Immunol Lett* 23: 155-159, 1989.
130. **Kay JE, Doe SE, Benzie CR.** The mechanism of action of the immunosuppressive drug FK506. *Cell Immunol* 124: 175-181, 1989.
131. **Keucho N, Sawada S, Kitamura K.** Effect of an immuno-suppressant, FK506, on interleukin 1 production by human macrofage-like celllin, U937. *Cellul Immunol* 132: 285-294, 1991.
132. **Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M.** FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot* 40, N° 9: 1249-55, 1987.

133. **Kino T, Hatanaka H, Miyata S.** FK506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK506 in vitro. *J Antibiot* 40: 1256-1265, 1987.
134. **Kino T, Inamura N, Sakai F.** Effect of human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc* 19 (suppl 6): 36-39, 1987.
135. **Kisner HJ.** Principles and clinical applications of image analysis. *Clin Lab Med* 8:723-736, 1988.
136. **Klintmalm G.B.G.** US multicenter prospective randomized trial comparing FK-506 to cyclosporine after liver transplantation: primary outcome analysis. Abstract presented at *The American Society of Transplant Surgeons 19th Annual Scientific Meeting, Houston, Texas, May, 1993.*
137. **Klintmalm, G.B.G., Goldstein, R., Gonwa T.** Prognostic factors for successful conversion from cyclosporine to FK 506-based immunosuppressive therapy for refractory rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 25: 641-643, 1993.
138. **Klintmalm, G.B.G., Goldstein, R., Gonwa, T.** Use of FK 506 for the prevention of recurrent allograft rejection after successful conversion from cyclosporine for refractory rejection. *Transplant Proc* 25: 635-637, 1993.
139. **Klintmalm, G.B.G., Goldstein, R., Gonwa, T.** Use of prograf (FK 506) as rescue therapy for refractory rejection after liver transplantation. *Transplant Proc* 25: 679-688, 1993.
140. **Kobayashi C, Kanai A, Nakajima A.** Suppression of corneal graft rejection in rabbits by a new immunosuppressive agent, FK506. *Transplant Proc* 21: 3156-3158, 1989.
141. **Krensky AM, Weis A, Cabtree G.** Lymphocyte-T antigen interaction in transplant rejection. *N Engl J Med* 322: 510-517, 1990.
142. **Kuroki H, Ikuta Y, Akiyama M.** Experimental studies of vascularized allogeneic limb transplantation in the rat using a new

- immunosuppressive agent, FK 506: morphological and immunological analysis. *Transplant Proc* 21: 3187-3190, 1989.
143. **Kuroki H, Ikuta Y.** Nerve regeneration of vascularized rat limb allograft and functional recovery of long-term graft survivals treated by short course of FK506 or cyclosporine. *Transplant Proc* 27, N° 1: 348-350, 1995.
144. **Kurtze T.** Microtechnique in neural surgery. *Clin Neurosurg* 12: 128, 1964.
145. **Laín Entralgo P.** Historia de la medicina. *Ed Salvat.* p: 543, 1990.
146. **Lassner F, Schaller G, Steinhoff G.** Cellular mechanism of rejection and regeneration in peripheral nerve allografts. *Transplantation* Vol. 48, N°3: 386-392, 1989.
147. **Levinthal R, Brown WJ.** Preliminary observation on the immunology of nerve allograft rejection. *Surg Gynecol Obstet* Vol. 146: 57-58. Jan, 1976.
148. **Liu J, Albers MW, Wandless TJ.** Inhibition of Tcell signalling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 31: 3896-3901, 1992.
149. **Liu J, Farmer JD, Lane WS.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin and FKBP12-FK506 complexes. *Cell* 66: 807-815, 1991.
150. **Liu ZQ, Austin T, Thomas CDL, Clement JG.** Bone feature analysis using image processing techniques. *Comput Biol Med* 26(1):65-76,1996.
151. **Lundborg G, Gelberman RH, Longo FM, Powell MB, Varon MD.** In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 412, 1982.
152. **Lundborg G.** Nerve regeneration: nerve injury and repair. *Edinburgh: Churchill Livingstont*, 1988.
153. **Lundborg G, Longo F, Varon S.** Nerve regeneration model and neuronotrophic factors in vivo. *Brain Res* 232: 157, 1982.

154. **Lyscom N, Brueton MJ.** Intraepithelial, lamina propria and Peyer's path lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 45: 775-783, 1982.
155. **Mackinnon SE.** New directions in peripheral nerve surgery. *Ann Plast Surg* 22: 257-273, 1989.
156. **Mackinnon S, Dellon A.** Clinical nerve reconstruction with a Bioabsorbable Polyglycolic Acid Tube. *Plast Reconst Surg* vol. 85, N°3, 419, March, 1990.
157. **Mackinnon SE, Hudson AR.** Clinical application of peripheral nerve transplantation. *Annual Meeting of the American Association of Plastic Surgeons*, S. Antonio, Texas. April, 1991.
158. **Mackinnon SE, Hudson AR, Bain MD.** The peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration in the immunosuppressed host. *Plast Reconstr Surg*. March: 436-444, 1987.
159. **Mackinnon SE, Hudson AR, Falk R.** Nerve allograft response: A quantitative immunological study. *Neurosurg* 10: 61-84. 1982.
160. **Markus PM, van den Brink MRM.** Effects of in vitro treatment with FK506 on natural killer cells in rats. *Transplantation* 51: 913-915, 1991.
161. **Marmor L.** Regeneration of peripheral nerves by irradiated homografts. *J Bone Joint Surg* 46 A: 383, 1984.
162. **Martínez E, Paz J.** Manejo de la cirugía de trasplantes. *Universidad de Oviedo*. p: 13-38, 1996.
163. **Mattila PS, Ullman KS, Fiering S.** The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* 9: 4425-4433, 1990.

164. **Mc Caffrey PG, Perrino BA, Soderling TR.** NF-ATp, a lymphocyte-T DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* 268: 3747-3752, 1993.
165. **Mc Cauley J.** The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine. *Curr Opin Nephrol HTA* 2: 662-669, 1993.
166. **Mc Diarmid S and the U.S. Multi-Center FK 506 Liver Study Group.** A multi-center prospective randomized trial comparing FK 506 to cyclosporine (CyA) after liver transplantation: comparison of efficacy based on incidence, severity and treatment of rejection. *Abstract.* Presented at The American Society of Transplant Physicians 12th Annual Meeting, Houston, Texas, May, 1993.
167. **McDiarmid SV, Colonna JO, Shaked A.** Differences in oral FK506 dosage requirements between adult and pediatric liver transplant patients. *Transplantation* 55: 1328-1322, 1993.
168. **Mc Michel J, Irish W, Mc Cauley J.** Evaluation of a novel, intelligent, dosing system for optimizing FK 506 therapy. *Transplant Proc* 23: 2780-2782, 1991.
169. **Medawar PB.** The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat* 78: 176, 1944.
170. **Metcalfe SM, Richards FM.** Cyclosporine, FK506, and rapamycin. Some effects on early activation events in serum-free, mitogen-stimulated mouse spleen cells. *Transplant* 49: 798-802, 1990.
171. **Michon J.** Etat actuel des techniques de reparation des nerfs peripheriques. *Soc Franc Chir Orthop Traumat* p. 273, 1970.
172. **Midgley R, Woodhouse F.** Silicone rubber sheathing as an adjunct to neural anastomosing. *Can Med Assoc J* 98: 550, 1968.
173. **Millesi H.** Healing of nerves. *Clin Plast Surg* 4: 459, 1977.
174. **Millesi H.** Interfascicular nerve grafting. *Orthop Clin Nort. Am* 12: 287-301, 1981.

175. **Millesi H.** Peripheral nerve reconstruction. *World J Surg* Vol. 14, N°6, Nov/Dec, 1990.
176. **Moragas A.** Las técnicas de análisis y su aplicación an Anatomía Patológica. *Med Clin* 83(9):373-377,1984.
177. **Morel P, Rilo HLR, Tzakis AG.** Liver retransplantation in adults: overall results and determinant factors affecting the outcome. *Trasplant Proc* 23: 3029-3031, 1991.
178. **Morris AA, Jackso DM, Eady RP.** Protective effects of cyclophosphamide cyclosporin A and FK506 against antigen-induced lung eosinophilia in guinea-pigs. *Clin Exp Immunol* 89: 347- 350, 1992.
179. **Nakamura K, Yagihashi A, Iwaki Y.** The linfocytotoxic crossmatch in liver transplantation: a clinicopathologic analysis. *Transplant Proc* 23: 3021-3022, 1991.
180. **Nakao Y, Mackinnon S.** Monoclonal antibodies against ICAM-1 and LFA-1 prolong nerve allograft survival. *Muscle Nerve.* January: 93-100, 1995.
181. **Nalesnik M, Locker J, Jaffe R.** Experience with posttransplant lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. *ClinTransplant* 6: 249-253, 1992.
182. **Nalesnik MA, Todo S, Murase N.** Toxicology of FK-506 in the Lewis rat. *Transplant Proc* 19, N° 5, suppl 6, 89-92, 1987.
183. **Nicholson R, Seddon HJ.** Nerve repair in civil practice. Results of median and ulnar lesions. *Br Med J* 2: 1065, 1957.
184. **Nisbert-Brown E, CHEung RK, Lee JW.** Antigen-dependent increase in cytosolic free calcium in specific human T-lymphocyte clones. *Nature.* 316: 545-547, 1985.

185. **Norris RW, Blasby MA, Gattuso JM.** Peripheral nerve repair in humans using muscle autografts. A new technique. *J Bone Joint Europ* 70: 530-533, 1988.
186. **Ochia T, Nagata M, Nakajima K.** Studies on the effects of FK 506 on renal allografting in the beagle dog. *Transplantation* 44: 729, 1987.
187. **Ochiai T, Nakajima K, Nagata M.** Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc* 19 (1): 1284-1286, 1987.
188. **Ochiai T, Sakamoto K, Nagata M.** Studies on FK506 in experimental organ transplantation. *Transplant Proc* 20 (Suppl 1): 209-214. 1988.
189. **Ong SH, Jin XC, Sinniah JR.** Image analysis of tissue sections. *Comput Biol Med* 26(3):269-279,1996.
190. **Opelz G, Schwarz V, Engelmann A.** Long-term impact of HLA matching on kidney graft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplant Proc* 23: 373-375, 1991.
191. **Osedo M.** An xperimental study on nerve repair using carbon dioxide laser. *J Jpn Orthop Assoc* 62: 653-533, 1988.
192. **Pelekanou V, Trezise AE, Moore AL.** FK506 and rapamycin do not affect platelet aggregation or mitochondrial function. *Transplant Proc* 23: 3200-3201, 1991.
193. **Pérez-Caballer AJ:** Estudio experimental de los procesos de regeneración del sistema nervioso periférico bajo la influencia de campos electromagnéticos pulsátiles. *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Sept, 1993.*
194. **Perez-caballer aj, de pedro ja, lopez-casero r, tome jl, martinez a, lopez-duran l.:** Nerve Regeneration under Pulsatile Electromagnetic Fields. *Eur Surg Res* 1993, 25-S1: 75-76.

195. **Perez-caballer aj, de pedro ja, ortega l, martinez a y lopez-duran l.** Análisis morfométrico de la regeneración nerviosa periférica bajo el influjo de campos electromagnéticos pulsátiles. Estudio experimental en ratas. *Rev Ortop Traum* 1994, 38: 320-325.
196. **Pérez-Caballer A, De Pedro JA, López-Casero R, Rodriguez e, Dominguez i and López-Durán l.** Histoenzymologic response of peripheric nervous system regeneration after electromagnetic stimulation, XXIX Congress of the ESSR, May 16-19, Abstract book (Ed. L. Teot; B. Nordlinger; H. Baumel and R. Benichoux), 1994:105.
197. **Perez-Caballer AJ, De Pedro JA, López-Casero R y López Durán L.** Regeneración axonal bajo la influencia de campos electromagnéticos pulsátiles (PEMFs). XXXI Congreso SECOT Zaragoza. Abstract 1994:78.
198. **Pérez-Caballer A, De Pedro JA, López-Casero R, Fernández-Arroyo JM.** Viabilidad del alotrasplante de nervio periférico sometido a estimulación electromagnética mediante PEMFs. XXXII Congreso Nacional SECOT, Libro de Resúmenes, Sevilla, 1995: 149-150.
199. **Peters DH, Fitton A, Plosker GL.** Tacrolimus: a review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 46 (4): 746-794, 1993.
200. **Petrusz P, Ordronneau P, Finley JC.** Criteria of reliability for light microscopic immunocytochemical staining. *Histochem J* 12: 333-348, 1980.
201. **Pollard JD, Fitzpatrick.** Acomparision of the effects of irradiation and immunosuppressive agents on regeneration through peripheral nerve allografts: an ultrastructural study. *Acta Neuropathol (Berl.)* 23: 166-180, 1973.

202. **Porayco MK, Textor SC.** Nephrotoxicity of FK-506 and cyclosporine when used as primary immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 25: 665-668, 1993.
203. **Pugh-Humphreys RGP, Ross CSK.** Influence of FK506 on the thymus. An immunophenotypic and structural analysis. *Immunology* 70: 398-404, 1990.
204. **Raji AM.** An experimental study of the effects of pulsed electromagnetic field (Diapulse) on nerve repair. *J Hand Surg* Vol.9B, n°2, June, 1984.
205. **Randahawa P.S, Shapiro R Jordan M.L.** The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK 506. *Am J Surg Pathol* 17: 60-68, 1993.
206. **Robertson JD.** The unit membrane of cells and mechanism of myelin formation in ultrastructure and metabolism of the nervous system. *Proc Assoc Nerv Ment Dis Baltimore, Williams & Wilkins*, p. 64. 1962.
207. **Robinson AP, White TM, Mason DW.** Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 57: 239-247, 1986.
208. **Russ JC.** The image processing handbook, 2nd ed. Ed CRC, 1995.
209. **Sattler M, Guengerich FP, Yun CH.** Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK-506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 20: 753-761, 1992.
210. **Sakr M, Hassanein T, Gavalier J.** Cytomegalovirus infection of the upper gastrointestinal tract following liver transplantation-incidence, location, and severity in cyclosporin-and FK506-treated patients. *Transplantation* 53: 786-791, 1992.
211. **Sanders FK, Young JZ.** The degeneration and re-innervation of grafted nerves. *J Anat* 76: 143-163, 1943.

212. **Sato K, Yokota K, Matsui T.** Comparative study of FK 506, cyclosporine, and triple regimen immunosuppression with FK 506, cyclosporine and mizoribine. *Transplant Proc* 23 : 3296-3299, 1991.
213. **Schaller E, Berger A.** Peripheral nerve allograft. *Plast Reconstr Surg* , Dic: 870-871, 1987.
214. **Schreiber SL, Cabtree GR.** The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* 13: 136-142, 1992.
215. **Schroder JM, Seiffert KE.** Fascicular nerve graft using an empty perineural tube. *Microsurg* 4: 105, 1983.
216. **Seckel BR, Ryan SE, Simons JE, Gagne RG, Watkins E.** Vascularized versus nonvascularized nerve grafts: An experimental structural comparison. *Plast Reconstr Surg* 78: 211-220, 1986.
217. **Seddon HJ.** Three types of nerve injuries. *Brain* 66: 237, 1943.
218. **Seddon HJ.** Surgical disorders of peripheral nerves. 1st. Edition. Edimburgh. Churchill Livingstone. 1972.
219. **Shanklin WM, Azzam NA.** Histological and histochemical studies on the incisures of Schmidt-Lanterman. *J Comp Neurol* 206: 113-119, 1989.
220. **Shanthaverappa TR, Bourne GH.** The perineural epithelium, a metabolically active, continuous, protoplasmic, cell barrier surrounding peripheral nerve fasciculi. *J Anat*, 96: 527, 1962.
221. **Shapiro R, Jordan M, Fung J.** Kidney transplantation under FK 506 immunosuppression. *Transplant Proc* 23: 920-923, 1991.
222. **Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V.** FK 506 in kidney transplantation. *Transplant Proc* 23: 3065-3067, 1991.
223. **Shapiro R, Jordan M, Scantlebury V.** Randomized trial of FK 506/prednisone vs FK 506/azathioprine/prednisone after renal transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc* 25: 669-672, 1993.

224. **Shibata S.** Experimental study on revascularization of peripheral nerve graft in various treatments. *Jn Japan Soc Surg Hand* 12 (3): 496-501, 1995.
225. **Sigal NH, Dumont FJ.** Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10: 519-560, 1992.
226. **Sigal NS, Siekierka JJ, Dumont F.** Observations on the mechanism of action of FK506. *Biochem Pharmacol* 40: 2201-2208, 1990.
227. **Singh R.** The role of histocompatibility matching in the use of preserved nerve allografts. *Clin Neurol Neurosurg* Vol. 89-3: 129-135, 1987.
228. **Smith JW.** Factors influencing nerve repair. I: Blood Supply of peripheral nerves. *Arch surg* 93: 335, 1966.
229. **Starzl TE.** Experience in renal transplantation. W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1964.
230. **Staschak S, Wagner S, Block D.** A cost comparison of liver transplantation with FK 506 or C YA as the primary immunosuppressive agent. *Transplant Proc* 22 (suppl): 47-49, 1990.
231. **Stenberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HC.** The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complexes (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:104-169, 1970.
232. **Stenberger LA.** Immunocytochemistry. 2nd Ed. John Wiley and Sons Nueva York p:104-169, 1979.
233. **Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A.** Discovery of a Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein phosphatase. *FEBS Letters* 137: 671-674, 1982.
234. **Stock PG, Ascher NL, Osorio RW.** Standard sequential immunosuppression with Minnesota antilymphoblast globulin and

cyclosporine vs FK 506: a comparison of early nephrotoxicity. *Transplant Proc* 25: 675-676, 1993.

235. **Stookey B.** The futility of bridging nerve defects by means of nerve flaps *Surg Gynecol Obstet* 29: 287, 1919.

236. **Sunderland S.** The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves. *Brain* 68: 243, 1945.

237. **Sunderland S.** A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74: 491, 1951.

238. **Sunderland S.** A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74: 491, 1951.

239. **Sunderland S, Ray JL.** The intraneural topography of the sciatic nerve and its popliteal division. *Brain* 71: 242, 1968.

240. **Tabasco-Minguillan J, Miele L, Croll P.** Long-term insulin requirement after liver transplantation with FK 506 in american veterans. *Transplant Proc* 25: 677-678, 1993.

241. **Takaya S, Bronsther O, Iwaki Y.** The adverse impact on liver transplantation of using positive cytotoxic crossmatch donors. *Transplantation* 53: 400-406, 1992.

242. **Takaya S, Bronsther O, Todo S.** Retransplantation of liver: a comparison of FK 506 and cyclosporine-treated patients. *Transplant Proc* 23: 3026-3028, 1991.

243. **Tanaka H, Kuroda A, Marusawa, H.** Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* 19 N° 5, suppl 6: 11-16, 1987.

244. **Taylor GI, Ham F.** The free vascularized nerve graft. A further experimental and clinical application of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 57, 413-426, 1976.

245. **Terzis J.** Nerve repair using CO₂ laser. *Symposium Peripheral Nerve Surgery Today*, Vienna 23-26. November, 1991.
246. **Therkelsen J, Pool JL.** Stored nerve grafts for two-stage sciatic nerve repair in dogs. *J Neurophat Exp Neurol* 16: 383, 1957.
247. **Thomas PK.** The deposition of collagen in relation to Schwann cell basement membrane during peripheral nerve regeneration. *J Cell Biol* 23: 275-382, 1964.
248. **Thomson AW, Pugh-Humphreys RGP.** Antilymphocytic activity of FK506 and its influence on the thymic microenvironment. Kendall & Ritter (eds.) *Thymus Update* 4: 93-127, 1991.
249. **Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA.** The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expresion of early Tcell activation genes. *J Immunol* 143: 718-726, 1989.
250. **Toddo S, Demetris A, Ueda Y.** Renal transplantation in baboons under FK506. *Surgery* 106 (2): 4444-451, 1989.
251. **Todo S, Fung JJ, Tzakis A.** One hundred ten consecutive primary orthotopicliver transplants under FK 506 in adults. *Transplant Proc* 23: 1397-1402, 1991.
252. **Todo S, Murase N, Ueda Y.** Effect of FK-506 in experimental organ transplantation. *Transplant Proc* 19, N°1, suppl 1, 215-219, 1988.
253. **Tomas D, De Pedro JA, López Bravo A y San Roman J.** Biocompatibilidad de fibras huecas preparadas a partir de polímeros de interés biomédico. I Congreso Nacional sobre biomateriales (Abstract). Fundación MAPFRE Medicina, Avila, 1996: 115.
254. **Torre-Cisneros J, Mañez R, Kusne S.** The spectrum of aspergillosis in liver transplantat patients: comparision of FK 506 and cyclosporine immunosuppression. *Transplant Proc* 23: 3040-3041, 1991.

255. **Tzakis AG, Fung JJ, Todo S.** Use of FK506 in pediatric patients. *Transplant Proc* 23: 924-927, 1991.
256. **Tzakis AG, Reyes J, Todo S.** FK506 versus cyclosporine in pediatric liver transplantation. *Transplant Proc* 23: 3010-3015, 1991.
257. **Tzakis AG, Reyes J, Todo S.** Two-year experience with FK506 in pediatric patients. *Transplant Proc* 25: 619-625, 1993.
258. **Uemoto S, Tanaka K, Honda K.** Experience with FK506 in living-related liver transplantation. *Transplantation* 55: 288-292, 1993.
259. **Valdivia LA, Fung JJ, Demetris AJ.** Differential survival of hamster-to-rat liver and cardiac xenografts under FK506 immunosuppression. *Transplant Proc* 23: 3269-3271, 1991.
260. **Vaquero C.** Manual de experimentación animal. Universidad de Valladolid, p:131-176, 1993
261. **Venkataramanan R, Jain A, Cadoff E.** Pharmacokinetics of FK-506: preclinical and clinical studies. *Transplant Proc* 22, suppl 1: 52-56, 1990.
262. **Waller AV.** Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil Trans R Soc* 423-429, 1850.
263. **Wang SC, Zeevi A, Jordan ML.** FK506, rapamycin, and cyclosporine: effects on IL-4 and IL-10 mRNA levels in a T-helper 2 cell line. *Transplant Proc* 23: 2920-2922, 1991.
264. **Weinberg H, Spencer P.** The fate of Schwann cells isolated from axonal contact. *J Neurocytol* 7: 555, 1968.
265. **Weiss P.** Experiments on nerve repair. *Trans Am Neuro Assoc* 69: 42, 1943.
266. **Weiss L.** Histología. Ed. Ateneo. 4° Ed.: 297-300, 1982.

267. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Basic principles of image processing. *Am J Clin Pathol* 98(5):494-501,1992.
268. Wessel K, Müller H. Electrophysiological study of regenerated rabbit tibial and peroneal nerves: autologous versus non-neural grafts. *Electromyog Clin Neurophysiol* 34: 259-264, 1994.
269. Wied GL, Bartels PH, Bibbo M. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* 20:549-571,1989.
270. Williams AF, Galfre G, Milstein, C. Analysis of cell surfaces by xenogenic myeloma hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* 12: 663-637, 1977.
271. Wise AC, Touptztu C, Davis P, Kaye IS. A comparative study of a macro and micrisurgical neurorraphy technique. *Am J Surg* 117: 566, 1969.
272. Woo J, Propper DJ, Thomson AW. Antigen presentation and HLA-DR expression by FK506-treated human monocytes. *Inmmunology* 71: 551-555, 1990.
273. Yagihashi A, Kobayashi M, Noguchi K. HLA matching in liver trasplantation. *Transplant Proc* 24: 2432-2433, 1992.
274. Yahr MD, Beebe, GW. Recovery of motor function. Chapter 3 in *Peripheral in Nerve Regeneration, a follow-up study of World War II injuries*. VA Medical Monograph. B. Woodhall Editors. Washington D.C. U.S. Government Printing office. 1959.
275. Yoshimura N, Matsui S, Hamashima T. Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on human lymphocyte responses in vitro.II. Inhibition of the production of IL-2 and g-IFN, but not B cell-stimulating factor 2. *Transplantation* 47: 356-359, 1989.
276. Yu LT, England J Summer A. Electrophysiologic evaluation of peripheral nerve regeneration through allografts immunosuppressed with cyclosporin. *J Reconstr Microsurg* Vol. 6. N°4: 317-323, 1990.

277. Yu LT, Hickey WS. Expression of class II antigens on peripheral nerve allografts. *Ann NY Acad Sc* 540: 472-474, 1988.
278. Yu Y, Yuzawa K, Otsuka M. Mutagenicity of the new immunosuppressive drugs, FK 506, and spargualin. *Transplant Proc* 25: 2116-2118, 1993.
279. Zalewski AA, Gulati AK.: Failure of cyclosporin A to induce immunological unresponsiveness to nerve allografts. *Exp Neuro* 83: 659, 1984.
280. Zienowitz, R., Thomas, B., Kurtz, W., Orgel, M.: A multivariate approach to the treatment of peripheral nerve transection injury: The role of electromagnetic field therapy. *Plast. Reconstr. Surg.* 87/1: 122-129, 1991.
281. Zoch G, Beer R, Reishner R, Millesi, H. Anpassung des N. medianus an extreme Beugung und Streckung der oberen Extremitat. *Acta Chi Austriaca* 5/6: 491, 1986.