

**EFFECTES DE L'FK506, UN LLIGAND
D'IMMUNOFILINES, SOBRE LA REGENERACIÓ
NERVIOSA**

Esther Udina i Bonet

TESI DOCTORAL

2004



Efectes de l'FK506, un lligand d'immunofilines, sobre la regeneració nerviosa

Esther Udina i Bonet

Memòria de Tesi presentada per Esther Udina i Bonet per optar al grau de
Doctora en Medicina i Cirurgia per la Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, Gener 2004

Director de Tesi:

Dr. Xavier Navarro Acebes

Catedràtic
Unitat de Fisiologia mèdica
Departament de Biologia Cel.lular,
Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona



Agraïments:

Aquesta tesi no hagués estat possible sense l'ajuda i el suport del meu director, el Dr. Xavier Navarro. Vull agrair-li la seva confiança, tantes hores dedicades i tot el que m'ha ensenyat i he pogut aprendre en el seu grup, tant a nivell científic com docent.

A la Dolores Ceballos vull agrair-li que m'introduís en el món de la histologia. Sense ella, la part morfològica d'aquesta tesi no hagués estat possible. Com no, també vull agrair-li la seva amistat, els seu suport i els seus bons consells.

Al Bruce Gold, perquè sense el seu "FK" aquesta tesi no hagués nascut. Li agraeixo també la seva càlida acollida al seu laboratori d'Oregon i la correcció dels nostres articles.

Al Guillem Garcia, el meu infatigable company de penes i alegries durant aquests més de quatre anys compartits. Sempre admiraré que haguem pogut fer junts les nostres tesis sense caure mai en l'absurd de la competència. Li agraeixo la seva amistat, el seu suport i la seva confiança.

A la Natàlia Lago i al Rubén López, els successors. Ells van marcar un abans i un després al laboratori, i gràcies a la seva vitalitat i al seu entusiasme, els meus darrers anys de tesi han estat els millors. Molt especialment vull agrair a la Natàlia la seva ajuda (mai ensenyar havia resultat tan rentable!) i tants bons moments compartits dins i fora del lab.

Al Toni Valero i al Fran X. Rodríguez, els predecessors, que em semblaven inabastables quan iniciava la meva tesi i em continuen semblant inabastables ara que són brillants postdocs. Els agraeixo la seva generositat compartint saber i experiència.

A la Mònica Espejo i a la Jèssica Jaramillo, agrair-los les incomptables hores dedicades a la meva tesi, la seva inestimable ajuda, el seu suport i tantes rialles compartides.

Als altres companys de grup, l'Albert Brillas, en Quim Forés, l'Enric Verdú, el Jorge Vilches i en Rafa Labrador, per la seva ajuda i els seus consells, i a en Jan Voda, per la seva col·laboració durant la meva estada a Oregon, al laboratori d'en Bruce Gold. A la resta de companys de la Unitat de Fisiologia, sense oblidar en Jordi Bruna i la Maite Cordero, per haver fet més amenes tantes hores compartides a la facultat.

Als companys i amics de l'AENC, per haver donat una nova dimensió a la ciència i haver-me ensenyat a veure molt més enllà del meu tema de recerca.

També vull agrair a totes les meves amistats extralaborals, en especial les de tota la vida (25 anys, que no són pocs: Carlo, Noe, Lore) i les de tota la carrera (10 anys ja: Suki, Rumi, Torri&Torri i companyia), l'haver-me obligat a recordar que també existeix vida fora del lab i, com no, perquè sempre les he tingut al costat i m'han donat suport incondicional en aquests més de quatre anys de feina.

A l'Àlex i en Marc, per ser els meus germans.

Sincerament i de manera especial, als meus pares.

Als meus pares

ÍNDEX D'ABREVIATURES

CMAP	<i>Compound muscle action potential</i>
CNAP	<i>Compound nerve action potential</i>
CS	Cèl·lules de Schwann
CsA	Ciclosporina A
CyP	Ciclofilina (immunofilina que s'uneix a la CsA)
d	dies
dpo	dies post operatoris
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FK	FK506 o tacrolimus
FKBP	<i>FK506 binding protein</i> (immunofilina que s'uneix a l'FK506)
FRI	<i>Functional recovery index</i>
GAP	<i>Growth associated protein</i>
GS	Glàndula sudorípara
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IRF	Índex de recuperació funcional
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
n	nombre d'animals
NC	Nocicepció
NF-AT	Transcriptor nuclear dels limfòcits T
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PAMC	Potencial d'acció muscular compost
PANC	Potencial d'acció nerviós compost
PP	<i>Pin prick test</i>
Rapa	Rapamicina
+rg	nombre d'animals amb regeneració
SC	<i>Schwann cells</i>
sc	subcutani
SR	<i>steroid receptor</i>

ÍNDEX

	Pàg.
INTRODUCCIÓ	
Les lesions del nervi perifèric.....	1
Quadre clínic	1
Tipus de lesions.....	2
Degeneració i regeneració axonal.....	3
Reacció neuronal.....	3
Degeneració walleriana.....	4
Regeneració axonal	5
Reinnervació dels òrgans diana denervats	6
Mètodes de reparació de les lesions nervioses	9
Sutura directa	9
Interposició d'un empelt nerviós.....	9
Tubulització nerviosa.....	11
Mètodes per promoure la regeneració nerviosa	13
Els fàrmacs lligands d'immunofilines	14
Les immunofilines	15
Acció immunosupressora dels lligands d'immunofilines.....	16
Efectes dels lligands d'immunofilines sobre el sistema nerviós ...	19
Immunofilines en el sistema nerviós	20
OBJECTIUS.....	23
DISSENY EXPERIMENTAL	25
Model experimental	25
Lesions nervioses i reparacions	25
Resum del disseny experimental dels treballs desenvolupats	26
RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ	
Relació dosi-efecte de l'FK506	31
Efectes de l'FK506 en lesions nervioses lleus.....	32
Efectes de l'FK506 en lesions nervioses severes (reseccions).....	33
Reparació per empelts.....	33
Tubulització nerviosa.....	34
Administració contínua o discontinua d'FK506.....	36
Efectivitat de l'FK506 sobre els diferents tipus de reparacions	38
Probable mecanisme d'acció de l'FK506 sobre la regeneració nerviosa	39

CONCLUSIONS	42
BIBLIOGRAFIA	44
TREBALLS	57

Treball 1

Bimodal dose dependence of FK506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. Udina E, Ceballos D, Verdú E, Gold BG, Navarro X. *Muscle Nerve* 2002, 26:348-355.

Treball 2

FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. Udina E, Ceballos D, Gold BG, Navarro X. *Exp Neurol* 2003, 183: 220-231.

Treball 3

Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. Navarro X, Udina E, Ceballos D, Gold BG. *Muscle Nerve* 2001, 24: 905-915.

Addenda al Treball 3:

Effects of continuous administration of FK506 on regeneration through silicone guides in a 6 mm gap in the sciatic nerve of the mouse

Treball 4

Comparative dose-dependence study of FK506 on transected mouse sciatic nerve repaired by allografts or xenografts. Udina E, Voda J, Gold BG, Navarro X. *J Periph Nerv Syst* 2003, 8:145-154.

Treball 5

Comparison of continuous and discontinuous FK506 administrations on autograft or allograft repair of sciatic nerve resection. Udina E, Gold BG, Navarro X. (*Manuscrit*)

Addenda al Treball 5:

Long term effects of discontinuous administration of FK506 on regeneration through allogeneic grafts in the sciatic nerve of the mouse.

Treball 6

FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic Schwann cells. Udina E, Rodríguez FJ, Verdú E, Espejo M, Gold BG, Navarro X. (*Manuscrit*)

ANNEX

Las inmunofilinas: agentes neuroprotectores y promotores de la regeneración neural. Udina E y Navarro X. *Neurología* 2002, 17: 200-213 (*Article de revisió*).

INTRODUCCIÓ

LESIONS NERVIOSES PERIFÈRIQUES

Les lesions dels nervis perifèrics comporten alteracions estructurals i la consegüent pèrdua, ja sigui aguda o progressiva, de les funcions del control neural motor, sensorial i neurovegetatiu de les zones innervades per les fibres nervioses lesionades. Aquestes lesions provoquen dèficits de grau variable, en funció de la severitat de la lesió, que solen ser incapacitants per a l'individu. Si bé el nervi perifèric dels mamífers té la capacitat de regenerar després d'una lesió, la recuperació funcional no està garantida. La severitat de la lesió determinarà el grau de recuperació final, i la restitució *ad integrum* queda limitada a les lesions més lleus. Després de la lesió, les neurones lesionades que sobreviuen pateixen un seguit de canvis encaminats a promoure la regeneració del seu axó seccionat, per tal de poder tornar a reinnervar el seu òrgan diana. Per altra banda, el nervi distal també patirà canvis per així facilitar el camí als axons regenerants. A més a més, axons de zones veïnes que no s'hagin vist afectats per la lesió també reaccionaran davant de la lesió i, mitjançant el fenomen de ramificació col·lateral, enviaran branques als òrgans denervats per tal de reinnervar-los i compensar la pèrdua de funció tot expandint el seu territori d'innervació. Finalment, l'organisme pot compensar la pèrdua funcional mitjançant la reorganització estructural i funcional dels circuits nerviosos relacionats. No obstant, aquests mecanismes són limitats i no sempre es traduiran en una correcta recuperació funcional. Per altra banda, la regeneració dels axons només és un requisit per a la recuperació funcional i també és important la correcta orientació d'aquests i l'adequada reinnervació del teixit diana.

Quadre clínic

La zona i l'extensió de l'afectació dependrà del nervi afectat i de l'alçada de la lesió. No només hi ha més mort neuronal com més proximal és la lesió sinó que les afectacions dels plexes o dels grans troncs nerviosos són molt més invalidants i severes ja que afecten un territori molt més extens que les lesions més distals. La lesió dels axons de les motoneurones comporta la pèrdua de funció dels músculs que innerven, que es traduirà en una disminució de força o paràlisi, acompanyada de l'atròfia del múscul denervat. La lesió dels axons aferents comportarà la pèrdua o alteració de les diferents modalitats sensorials. Finalment, també haurà una afectació dels axons autonòmics, amb la consegüent pèrdua de la regulació sudomotora, vasomotora i piloerectora.

Paral·lelament a aquesta pèrdua o disminució de la funció dels òrgans denervats, també es poden observar el que s'anomenen símptomes positius. Els músculs esquelètics denervats poden excitar-se de manera espontània. L'excitació de fibres aïllades (les anomenades fibril·lacions) només s'observa mitjançant tècniques electromiogràfiques, però l'excitació d'unitats motores, les fasciculacions, o de tot el múscul, els espasmes, comporten un moviment aparent. La percepció sensorial també pot presentar alteracions i els pacients poden referir dolor espontani, hiperalgèsia (percepció incrementada del dolor) i al·lodínia (percepció dolorosa d'estímuls que no ho són). En els amputats es pot donar la síndrome del membre fantasma, on el pacient continua percebent l'extremitat amputada i pot descriure dolor referit a aquesta zona quan s'estimulen altres parts (Omer et al., 1998). Per altra banda, els òrgans diana de les fibres autonòmiques es fan hipersensibles als neurotransmissors i als seus agonistes quan queden denervats (Cannon 1939), fet que pot traduir-se en augments exagerats de la resposta autonòmica.

Tipus de lesions

Les lesions nervioses poden ser d'origen molt divers (agressions mecàniques, tèrmiques, isquèmiques, químiques). Les lesions nervioses mecàniques es classifiquen en base a la morfologia de la lesió, als seus requeriments terapèutics i al seu pronòstic (Seddon 1943, Sunderland 1951), Seddon va classificar les lesions en tres categories:

- *Neurapràxia*: bloqueig de la conducció en un nervi on els axons estan preservats i es manté l'excitabilitat del nervi distal a la lesió.
- *Axonotmesis*: pèrdua de la continuïtat de l'axó però preservació dels tubs endoneurals.
- *Neuronotmesis*: Pèrdua de continuïtat, no només dels axons sinó també dels elements connectius del nervi. En aquestes situacions, tant si hi ha una secció complerta com una desorganització important del teixit nerviós, la regeneració espontània no es dona (Seddon 1943).

En una classificació més acurada, Sunderland (1978) va descriure cinc graus de gravetat (Fig. 1):

- Grau 1 i 2 corresponen, respectivament, a la neurapràxia i l'axonotmesis de Seddon, mentres que va subdividir la Neuronotmesis en 3 grups:
- *Grau 3*: Es manté intacte el perineuri
- *Grau 4*: Es preserva l'endoneuri.
- *Grau 5*: Pèrdua de continuïtat de tot el tronc nerviós.

El 5è grau de Sunderland es veuria agreujat si s'hi afegís una pèrdua de teixit nerviós, fet que comportaria parlar de resecció nerviosa.

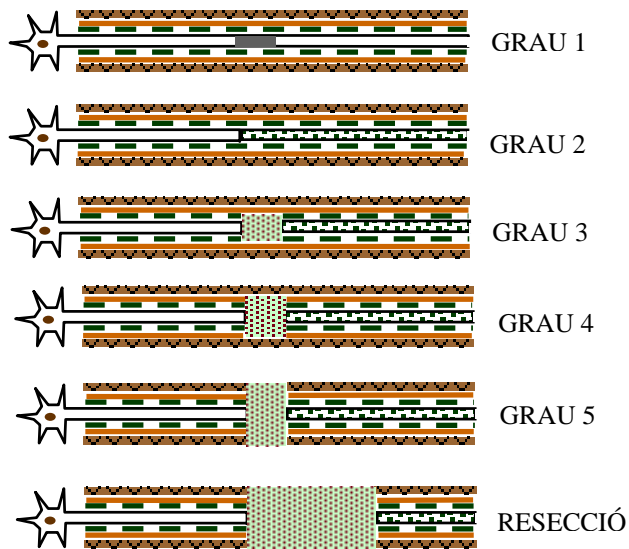


Fig 1. Esquema dels diferents graus de severitat de les lesions nervioses segons la classificació de Sunderland.

El nervi perifèric es representa esquemàticament amb un únic axó i la línia discontinua és l'endoneuri, que s'afecta a partir del grau 3.

DEGENERACIÓ I REGENERACIÓ AXONAL

Reacció neuronal

Després d'una axotomia, les neurones axotomitzades pateixen canvis importants, ja que han de passar d'un estat transmissor a un estat de creixement. El soma neuronal presenta un seguit de canvis morfològics, l'anomenada cromatolisi, ja que el nucli es fa excèntric, augmenta de volum, com el nucleol i el soma. A més a més, augmenta el nombre de lisosomes, i l'aparell de Golgi i les mitocondries s'hipertrofien. Els grànuls de Nissl -els ribosomes del reticle endoplasmàtic- es desorganitzen en resposta a la necessitat d'un increment en la síntesi de proteïnes. La lesió axonal provoca l'entrada d'elevades concentracions de calci dins de la neurona (Greenberg et al., 1986, Morgan i Curran., 1986) i la supressió del transport retrògrad de factors tròfics (Lunn et al 1990), que comportarà l'expressió de gens primerencs (*immediate early genes*, IEGs). La seva activació conduirà a la síntesi de proteïnes que, al seu torn, activaran els gens tardans (*late response genes*, LRGs). Seran aquests segons els encarregats de sintetitzar proteïnes amb funció específica (Sheng i Greenberg, 1990).

Degeneració walleriana

Els canvis cel·lulars i moleculars del segment distal que segueixen a una lesió nerviosa, coneguts com a degeneració walleriana, seran determinants en l'èxit de la regeneració axonal i la recuperació funcional posterior. Els canvis inclouen: la fragmentació

dels axons seccionats, la lisi de la mielina, el reclutament de macròfags hematògens dins de l'endoneuri, la fagocitosi del material degradat per cèl·lules de Schwann i macròfags, i la proliferació de cèl·lules de Schwann que formen bandes de Bünger, columnes de cèl·lules de Schwann disposades formant tubs endoneurals amb la làmina basal al llarg del segment distal (Wood i Bunge, 1975; Pellegrino et al., 1986).

Les cèl·lules de Schwann mielinitzants no posseeixen unes condicions que afavoreixin el creixement neural, de manera que sembla determinant que aquestes cèl·lules es facin immadures després de la lesió i comencin a proliferar. Es poden destacar dues fases proliferatives. La primera es correlaciona amb la pèrdua de contacte amb l'axó i amb l'arribada de macròfags al segment distal (Perry et al., 1987), mentre que la segona es relaciona amb el contacte dels axons regenerants (Pellegrino i Spencer, 1985). El pic màxim de proliferació és a la setmana, mentre que als 28 dies ja es recuperen els nivells basals. (Cohen et al., 1992).

Les cèl·lules de Schwann segmenten les restes de mielina i inicien al degradació de la seva pròpia mielina (White et al., 1989), alhora que secreten factors quimioattractius, com el LIF (Curtis et al., 1994), per tal d'atreure els macròfags hematògens, els principals fagocitadors de la mielina (Stoll and Muller, 1986, Perry et al., 1987, Stoll et al., 1989). Dos dies després de la lesió, macròfags i limfòcits T envaeixen la zona de la lesió i, en quatre dies, s'han estès per tot el segment distal (Perry et al., 1987).

Per altra banda, en el nervi intacte, la producció de NGF per part de les cèl·lules de Schwann és mínima, i les neurones que depenen d'aquest factor neurotròfic per sobreviure l'obtenen, bàsicament, dels seus òrgans diana mitjançant transport retrògrad. L'augment de producció de NGF a les cèl·lules de Schwann després d'una lesió (Heumann et al., 1987 a, b) suposaria una font temporal d'aquest factor per a les neurones denervades i ajudaria a evitar-ne la mort (Johnson et al., 1988). Per altra banda, és essencial que les neurones axotomitzades rebin suport tròfic que els garanteixi la supervivència mentre estan denervades. Aquest abastiment pot provenir del segment distal del nervi o dels òrgans denervats, si bé la capacitat de les motoneurones de sobreviure més d'un any fins i tot quan estan desconnectades de l'extrem distal (Carlsson et al., 1979) suggereix que la glia medul·lar o elles mateixes poden secretar aquests factors (Fu and Gordon, 1997).

Regeneració axonal

En el segment proximal, els axons es retireuen fins al primer node de Ranvier i les cèl.lules de Schwann que els envolten patiran els mateixos canvis que al segment distal. Els axons començaran a créixer tot donant una gran quantitat de ramificacions (entre 50 i 100), que formaran un neuroma si l'ambient distal no afavoreix la regeneració (Friede and Bischhausen, 1980). Si l'ambient és favorable, una mitjana de 5 ramificacions començarà a créixer (Gutmann and Sanders, 1943; Toft et al., 1988). No obstant, si es dona la reinnervació distal, amb el temps s'eliminaran totes les ramificacions menys una (Mackinnon et al 1991). Quan els axons arribin al segment distal, estimularan la segona ona de proliferació de les cèl.lules de Schwann (Wood and Bunge, 1975). Els axons lesionats són capaços de regenerar tant si estan en contacte amb les cèl.lules de Schwann com amb la làmina basal, ja que presenten diverses molècules d'adhesió, com laminina (LB) i *neural cell adhesion molecules* (N-CAM i L1) (Martin and Schachner 1988) i caderines. Per contra, les restes de mielina es consideren repel·lents de la regeneració. Els axons regenerants del segment proximal han de saltar el teixit connectiu per arribar al segment distal. En la matriu extracel·lular, els axons van a cercar la làmina basal, molt rica en laminina. A través de les integrines, que s'uneixen a la laminina, els axons podran adherir-se a la làmina basal i moure's. Per altra banda, les cèl.lules de Schwann sobreexpressaran N-CAM i L1 després de la lesió i permetran el creixement axonal a través de les bandes de Büniger. Per contra, les caderines medien el creixement axonal sobre les columnes de cèl.lules de Schwann, ja que medien la unió entre cèl.lules (axó-cèl.lula de Schwann o axó-axó) però no amb la làmina basal (Ide, 1996).

Les cèl.lules de Schwann, a més, són una font de factors tròfics per als axons regenerants. Al tornar-se proliferants després d'una lesió, secreten, pèptids de la família de les neurotrofines (NGF, BDNF, NT-3, y NT-4/5), factors de creixement de fibroblasts (b-FGF, a-FGF), citoquines (CNTF, IL-1, IL-6, LIF y TNF- α), factors de creixement del tipus insulina (IGF-I y II), factors derivats de cèl.lules glials (GDNF), heregulinas (NDF, GGF) i altres (PDGF, EGF) (Liu 1996, Fu y Gordon 1997, Heumann et al. 1987b). Els axons aniran creixent distalment a través del gradient de concentració d'aquests factors tròfics (Kuffler 1986).

L'extrem distal de l'axó regenerant emet fines extensions anomenades conus de creixement (Fawcett i Keynes, 1990), estructura especialitzada responsable del creixement, la guia i el reconeixement dels òrgans diana (Landis, 1983). El material necessari per estendre els conus de creixement es transporta per transport anterògrad, i sembla que s'integra a la

membrana mitjançant vesícules que s'hi fusionen, a través d'un mecanisme semblant a la fusió de les vesícules sinàptiques (Südhof i Jahn, 1991; Ide, 1996). Per altra banda, els dos elements claus en el creixement del conus són els microtúbuls i els filaments d'actina. Els microtúbuls són els responsables de l'elongació de les neurites, mentre que els filaments d'actina són indispensables per a la motilitat dels filopodis i lamelipodis del conus de creixement (revisió, Letourneau et al., 1996). La concentració de ions calci intracel·lulars afecta l'ensamblatge dels elements del citoesquelet, de manera que el calci és un regulador intracel·lular clau en l'elongació de les neurites i la motilitat dels lamelipodis i filopodis del conus de creixement, si bé aquests dos components estan regulats per diferents concentracions de calci, i un influx crític de calci que redueixi la motilitat incrementarà l'elongació de les neurites (Mattson and Kater, 1987). La proteïna GAP-43 es troba associada a la membrana plasmàtica dels conus de creixement en grans quantitats (Van Lookeren Campagne et al., 1989) i s'ha relacionat amb l'extensió de les neurites i amb la ramificació i l'adhesió dels conus de creixement (Aigner i Caroni, 1995). La GAP-43 és fosforil·lada per la proteïna cinasa C (PKC), de manera que podria ser una proteïna clau en la transducció de senyals intracel·lulars dels conus en extensió (Meiri et al 1991). No obstant això, la GAP-43 també activa una proteïna G que inhibeix el conus de creixement en cultius (Strittmatter et al., 1994), fet que suggereix un efecte dual d'aquesta proteïna. Per altra banda, la GAP-43 no és específica de neurones i es troba també sobreexpressada en les cèl·lules de Schwann proliferants després d'una lesió (Curtis et al., 1992). Si bé no es coneix com, la GAP-43 podria estar implicada en la capacitat d'aquestes cèl·lules d'estendre els processos citoplasmàtics i de moure's (Ide, 1996). Per contra, les cèl·lules de Schwann terminals de la placa muscular i les especialitzades que envolten els axons aferents, no proliferen després d'una lesió, però la denervació comporta que presentin immunoreactivitat contra la GAP-43, que probablement juga un paper important en l'elaboració o el remodelatge dels processos citoplasmàtics (Woolf et al., 1992, Dubovy and Aldskogius 1996).

REINNERVACIÓ DELS ÒRGANS DIANA DENERVATS

La reinnervació dels òrgans diana que havien quedat denervats i la maduració dels axons regeneratius una vegada aquests han reinnervat el seu teixit diana poden considerar-se una de les fases terminals del procés de regeneració nerviosa. La reinnervació comporta importants canvis de les neurones regeneratives, ja que aquestes han de transformar els seus conus de creixement en botons presinàptics. Per una banda, la inhibició de l'avanç dels axons

regeneratius mitjançant la polimerització de nous microtúbuls sembla estar mediada per la fosforil·lació de GAP-43 (Skene 1989), fet que provoca una reducció en els processos de fosforil·lació i en la concentració d'ions calci lliures, que impossibilita la polimerització de nous microtúbuls i, per tant, l'avanç de l'axó regeneratiu (Strittmatter et al., 1991). Per altra banda, aquest procés comporta un augment del transport de vesícules que es fusionen amb la membrana del conus de creixement, augmentant la seva superfície i el seu volum citoplasmàtic. D'aquesta manera, aquestes vesícules aporten lípids i proteïnes de membrana que configuren la membrana presinàptica, al mateix temps que s'incrementa i s'estabilitza el citoesquelet de l'axó regenerant i augmenta el transport d'òrgànuls i de vesícules de neurotransmissors (Kelly i Grote 1993).

Les cèl·lules de Schwann no només juguen un paper decisiu en la regeneració axonal, sinó també en la reinnervació perifèrica. Així, podem veure que en la unió neuromuscular les cèl·lules de Schwann no mielinitzades responsables del recobriment de la unió neuromuscular (les anomenades cèl·lules terminals) participen en el manteniment i la reparació de les sinapsis neuromusculars. En situacions de denervació muscular, aquestes cèl·lules també contribueixen al manteniment dels miòcits denervats, ja que migren cap a ells i alliberen acetilcolina (Brookes 1984), a més de generar extensions citoplasmàtiques que serveixen de guia per al creixement dels axons motors durant la reinnervació, inhibeixen l'elongació axonal en les proximitats de la placa neuromuscular i inicien la sinaptogènesi (Chiu et al., 1991; Son et al., 1996). Finalment, aquestes extensions citoplasmàtiques de les cèl·lules de Schwann terminals també s'estableixen entre plaques motores veïnes (Duvovy y Svizenska 1994), fet que permet la major ramificació terminal dels axons motors cap a fibres musculars veïnes.

No obstant això, la regeneració dels axons només és un prerequisit per a la recuperació funcional, i també és important la correcta orientació dels axons i la seva maduració adequada en la reinnervació del teixit diana.

Per altra banda, la reinnervació de teixits denervats després de la lesió d'un nervi també pot donar-se per axons de nervis pròxims que no s'hagin vist afectats per la lesió i que, mitjançant el fenomen de ramificació col·lateral, enviaran branques als òrgans denervats per tal de reinnervar-los i compensar la pèrdua de funció tot expandint el seu territori d'innervació (Diamond and Forester, 1992). En els mamífers, però, la reinnervació col·lateral només permet una recuperació funcional per les fibres de petit calibre, com les nociceptives A delta (Nixon et al., 1984) i C (Doucette i Diamond, 1987) i les simpàtiques sudomotores (Kennedy

et al., 1988; Navarro i Kennedy 1988) i pilomotores (Gloster i Diamond, 1988). Les fibres sensorials gruixudes no són capaces de donar ramificació col·lateral després de la denervació d'un territori veí (Devor et al., 1979, Jackson i Diamond 1984) tret d'en un període molt breu de l'etapa postnatal (Jackson and Diamond 1984), mentres que les motoneurons només tenen la capacitat de donar ramificacions en una zona restringida dins del mateix múscul (Brown et al 1981).

Per contra, totes les fibres, tant primes com gruixudes, són capaces de regenerar després d'una lesió. No obstant això, tenen una capacitat diferent d'assolir la reinnervació de les seves dianes (Navarro et al., 1994). Així, la reinnervació funcional per axons primis sudomotors i nociceptius s'inicia abans i assoleix nivells superiors que la d'axons mielítics gruixuts. En els axons musculars i sudomotors, la recuperació funcional té lloc aproximadament 48 hores després de l'aparició dels perfils nerviosos sobre aquests dianes (Verdú i Navarro, 1997), retard que tradueix el temps necessari per realitzar la neosinaptogènesi. Per contra, la recuperació funcional de la nocicepció apareix 48 hores abans de la detecció de perfils epidèrmics, ja que les terminals lliures poden començar a respondre a estímuls nociceptius des de punts profunds. Aquesta capacitat de respondre des de certa profunditat explica per què la recuperació funcional de la nocicepció sol ser molt bona, fins i tot en lesions per secció completa del nervi. La degeneració dels axons amielítics no va acompanyada de la formació de bandes de Bugner, de manera que aquests axons tenen dificultats per trobar punts per on travessar la membrana basal dermo-epidèrmica (Stankovic et al., 1996), però aquest fet no impedirà que els terminals puguin ser funcionals. Així mateix, també uns pocs axons sudomotors poden reinnervar un nombre normal de glàndules sudorípares degut a la seva capacitat de ramificació col·lateral i al fet que les glàndules poden secretar tot i estar parcialment denervades (Navarro et al., 1997, Verdú et al., 1997). En canvi, les fibres nervioses mielíniques gruixudes, per aconseguir una recuperació adequada, han de reconnectar apropiadament amb el seu òrgan diana segons un patró similar al normal o, si més no, compatible amb el desenvolupament de la funció. La reinnervació inespecífica d'aquestes fibres sol comportar disfuncions més notables que els errors comesos per fibres primes, on la localització és més grollera. El fet que una motoneurona reinnervi la fibra d'un múscul antagonista del que reinnervava prèviament, o que neurones sensorials canviïn el seu territori d'innervació cutani pot suposar més un inconvenient que un benefici per al pacient (Montserrat i Benito 1988; Sumner 1990).

MÈTODES DE REPARACIÓ DE LES LESIONS NERVIOSES

En les neuronotmesis (grau 3-5 de Sunderland) és obligada la intervenció quirúrgica, ja que la recuperació funcional de manera espontània és nul·la o molt reduïda. No obstant això, avui en dia encara no es disposa d'un mètode de reparació que garanteixi una bona recuperació en les lesions més severes. Cal tenir en compte que la situació ideal d'un laboratori no se sol donar en la clínica humana, i que depenent de l'estat del pacient, la naturalesa de la lesió i els mitjans tècnics i humans disponibles seran determinants per decidir quin és el millor moment per operar. En lesions agudes i netes es recomana la reparació nerviosa primària (Grabb 1986) ja que sol ser possible la coaptació directa dels extrems. En estadis posteriors, en canvi, la retracció i el teixit cicatricial no solen fer-ho possible. Per contra, en lesions lacerants o amb una gran destrucció del teixit veí, cal esperar a la reducció de la resposta inflamatòria associada per garantir una correcta reparació nerviosa. Per tant, és la naturalesa de la lesió la que determina el millor moment per a la intervenció (Ducker 1981).

Sutura directa

La coaptació dels extrems nerviosos seccionats es pot fer mitjançant sutura epineural. És una tècnica simple que suposa un mínim traumatisme associat a la intervenció, si bé no sempre garantirà un correcte alineament dels fascicles. Per contra, la reparació fascicular intenta assegurar una orientació òptima dels diferents fascicles tot suturant-los individualment. Però la manipulació necessària per suturar els diferents fascicles (resecció epineural i dissecció dels diferents fascicles) provoca un trauma quirúrgic important, que pot agreujar la lesió vascular associada a la lesió primària. Si bé alguns estudis no han mostrat avantatges de la sutura perineural respecte l'epineural en primats (Cabaud et al., 1980, Kline et al., 1981), la sutura fascicular milloraria l'especificitat de la reinnervació muscular (Brushart et al., 1983).

Interposició d'un empelt nerviós

En lesions severes o lacerants i en les intervencions secundàries, on és necessari reseca el teixit cicatricial, la sutura directe no sol ser possible. La tensió dels extrems no és recomanable, ja que altera el flux vascular, incrementa la formació de teixit cicatricial i disminueix la qualitat de la regeneració axonal (Lundborg, 1982). En aquests casos, es recomana la interposició d'un empelt nerviós que eviti una tensió excessiva al reempalmar els dos extrems. El major nombre de fibres a nivell de l'empelt i la reducció d'aquestes distalment

indica un cert grau de ramificació axonal en la primera sutura i una pèrdua de fibres a la segona.

Els empelts nerviosos són un magnífic substrat per la regeneració, ja que els seus tubs endoneurals originaris serviran de guia per als axons en creixement. Alhora, el material dels axons seccionats en degeneració podrà ser reciclat i reutilitzat i haurà un gran nombre de cèl.lules de Schwann reactives. L'empelt nerviós més utilitzat en clínica és l'empelt d'origen autòleg. L'empelt ideal resultaria d'implantar el mateix segment de nervi resecat, però és una situació que només és factible a nivell experimental. En clínica humana, per contra, cal sacrificar un nervi de menor jerarquia funcional (habitualment el nervi sural) per tal de poder obtenir material autòleg. No obstant, aquesta opció comporta una segona intervenció quirúrgica per al pacient i una pèrdua funcional afegida. Alhora, hi ha una limitació en l'obtenció del material i en la correspondència entre el calibre del nervi i de l'empelt.

L'obtenció d'empelts al·logènics no és problemàtica, però cal reduir la reacció immune per evitar la necrosi o fibrosi del teixit transplantat. Sembla que les cèl.lules de Schwann són les principals cèl.lules presentadores d'antígens dels nervis (Aguayo et al., 1979) ja que són la primera diana de la resposta immunològica de l'hoste. Una manera de reduir l'antigenicitat de l'empelt és fer-lo acel·lular. Mitjançant congelació, s'elimina la cel·lularitat però es manté la matriu extracel·lular, incloent la làmina basal (Anderson et al., 1983), la qual serà capaç de donar suport a la regeneració axonal. No obstant, la regeneració vindrà determinada per la migració prèvia de cèl.lules de Schwann de l'hoste (Anderson et al., 1983, Hall, 1986 a). Però degut a la limitada capacitat de migració d'aquestes cèl.lules, els empelts acel·lulars no són capaços de sostenir la regeneració a través de distàncies superiors als 40 mm en la rata (Hall, 1986 a, Nadim et al., 1990). Per altra banda, si bé es manté la làmina basal, s'ha vist que hi ha un decrement d'un dels seus components més actius a nivell neurotròfic, la laminina (Manthorpe et al., 1983), després del procés de congelació (Dubovy, 1998). També es pot bloquejar la resposta immune mitjançant tractament sistèmic amb immunosupressors com l'azatriopina i la hidro cortisona (Pollard i Fitzpatrick, 1973, Pollard et al., 1973; Mackinnon et al., 1987), la Ciclosporina A (CsA) (Zalewski and Gulati, 1984; Bain et al., 1988; Yu et al., 1990) o l'FK506 (Büttemeyer et al., 1995; Feng et al., 2001; Okajima et al., 2002). Sense tractament, les cèl.lules de Schwann són ràpidament rebutjades i substituïdes per cèl.lules del propi hoste (Lassner et al 1989, Ishida et al., 1993b, Midha et al 1994). En aquests casos, l'empelt esdevé acel·lular i, per tant, la seva capacitat de sustentar la regeneració és molt més pobre que la dels empelts amb cèl.lules viables (Gulati 1988). Per contra, mentres es manté la

immunosupressió, es mantenen les cèl·lules de Schwann allogèniques, sent aquestes les responsables de sostenir la regeneració dels axons de l'hoste (Midha et al., 1994). No obstant, en seguiments més llargs s'ha descrit un rebuig crònic de les cèl·lules de Schwann donants (Ishida et al. 1989). Degut a l'elevada toxicitat que suposa per al pacient un tractament immunosupressor sistèmic, amb un risc vital important, és discutible la seva utilització per garantir la recuperació funcional d'un nervi lesionat, sobretot si s'ha de mantenir indefinidament. Degut a que els axons regenerants són propis de l'hoste, si bé travessen l'empelt donador, seria d'esperar que una supressió del tractament immunosupressor quan la regeneració s'hagués consolidat no suposés una pèrdua funcional conseqüent, ja que els axons no serien rebutjats. No obstant, els estudis que han valorat la immunosupressió temporal són controvertits (Zalewski and Gulati, 1981; 1984; Yu et al., 1989), si bé en alguns casos s'ha descrit una certa recuperació funcional després del conseqüent rebuig degut a la retirada del tractament immunosupressor (Mackinnon et al., 1992, Ishida et al., 1993a, Midha et al., 1993a, 1993b).

La llargària dels aloempelts, així com la seva implantació distal, serà determinant per l'èxit de la regeneració, ja que és important que els axons regenerants creuin ràpidament l'empelt, abans la reacció de rebuig immunològic que patiran no alteri prou la seva estructura arquitectònica per impedir-ne el seu pas. (Pollard et al 1973). Un aloempelt de 8 cm en una ovella (Strasberg 1996) és massa llarg per sostenir la regeneració, mentre que un de 3 cm en la part distal de l'avantbraç de primats no demana immunosupressió per permetre una bona regeneració (Bain 1992).

Tubulització nerviosa

Els empelts nerviosos són un bon substrat per la regeneració si conserven la seva població cel·lular i són immunològicament compatibles. Però degut a la problemàtica de l'antigenicitat i a la limitació en l'obtenció de material autòleg, s'han buscat alternatives als empelts en les reseccions nervioses, com la tubulització, la interposició d'un tub biocompatible entre els extrems del nervi per tal que faci de guia als axons regenerants, previngui que aquests es desviïn cap a teixits veïns i faciliti, al condensar els factors tròfics alliberats pels extrems seccionats, la creació d'un microambient favorable en la promoció de la regeneració (Lundborg et al., 1982; Fields et al., 1989).

Després de la lesió, hi ha una extravasació de sèrum i altres fluids que ompliran ràpidament la llum tubular (Longo et al., 1983, Williams et al., 1985). El segment distal

nerviós allibera factors difusibles i les cèl.lules adjacents a la lesió secreten nutrients i factors tròfics per tal de promoure la regeneració. En una setmana, s'haurà format un pont de fibrina, amb fibroblasts, fibronectina, macròfags, leucòcits i eritròcits (Lundborg et al., 1982), que connectarà els dos extrems nerviosos. Aquest cordó serà la guia inicial per la migració dels fibroblasts, les cèl.lules de Schwann i per on avançaran els axons regenerants. Els fibroblasts proliferaran i migraran tant des de l'extrem distal com proximal tot formant capes concèntriques que remedaran el perineuri (Scaravilli, 1984). No està clar si les cèl.lules de Schwann migren amb els fibroblasts i formen part de l'ambient favorable per la progressió dels axons regenerants (Williams et al., 1983) o bé migren conjuntament amb els axons en creixement sobre una estructura primària de fibroblasts i vasos que han envaït la matriu de fibrina (Le Beau 1986), si bé s'ha vist que les cèl.lules de Schwann no necessiten els axons per migrar pel cordó de fibrina (Williams et al., 1993). Sigui com sigui, l'estructura final formada simularà un tronc nerviós i les fibres regenerants s'organitzaran en múltiples minifascicles envoltats de teixit perineural. Els fascicles formaran al seu torn un cordó sòlid que estarà envoltat de teixit connectiu que simularà l'epineuri. Inicialment, l'espai remanent entre el cordó i la llum tubular estarà ple de teixit connectiu, que acabarà sent substituït per teixit adipós (Lundborg 1988).

L'èxit de la regeneració dependrà tant del material i les característiques físiques del tub com de la distància entre els dos segments nerviosos seccionats. Així, s'ha vist que el diàmetre ideal dels tubs de silicona és aproximadament 1,5 vegades el diàmetre del nervi reparat, amb el mínim gruix de paret (Butí et al., 1996). Per altra banda, la permeabilitat de la paret (Jenq i Coggeshall 1987) i els materials reabsorbibles, com el col·lagen o els polímers de polilactat-caprolactona mostren millors resultats quan es comparen amb els que s'obtenen amb tubs de silicona (Chamberlain et al 1988, Navarro et al., 1996, Valeró-Cabré et al 2002), probablement degut a la seva major capacitat de subministrar nutrients als axons regenerants, d'impulsar la formació de la matriu inicial i del cordó cel·lular (Williams et al., 1987). Aquest subministrament extraneural seria crític en distàncies llargues, on els extrems veuen molt limitada la seva capacitat de formar el cordó inicial, fet que explica el major percentatge d'èxit en la regeneració d'aquests tubs davant dels tubs de silicona. Perquè un dels factors més limitants en l'èxit de la regeneració és la distància entre els dos extrems del nervi seccionat. Així, distàncies de 6 mm en el ratolí (Gómez et al., 1996, Butí et al., 1996; Rodríguez et al., 1999) o de 15 mm en la rata (Lundborg et al 1982, Williams et al., 1987) no es consideren subsidiàries de ser reparades mitjançant tubulització, degut al pobre èxit en la regeneració que

mostren. Per contra, quan la tubulització s'utilitza com una alternativa a la sutura directe i, pel mateix, els dos segments nerviosos estan propers, aquest mètode es mostra igual d'efectiu (Lundborg et al 1997, Navarro et al 1994). S'ha de tenir en compte, a més a més que, essent més fàcil la implantació d'un tub de silicona que no pas la sutura directe entre dos extrems nerviosos, aquesta alternativa quirúrgica suposaria una avantatge ja que el seu èxit no es veuria tan determinat per l'experiència del cirurgià.

Malauradament, la tubulització simple no subministra un substrat adequat per a la regeneració axonal quan la separació entre els extrems del nervi seccionat és relativament llarga. És per això que s'ha intentat millorar l'eficàcia de la tubulització mitjançant la introducció de diferents elements dins de la llum tubular. S'han introduït diferents components de la matriu extracel·lular, per tal de remedar el cordó que es forma inicialment, com matrius de fibrina (Williams 1987), de col·lagen (Madison et al., 1988; Labrador et al., 1998) o de laminina (Madison et al., 1988; Kaupila et al., 1993). No obstant, és important que la matriu introduïda tingui una densitat adequada (Labrador et al., 1995; 1998), ja que per excés dificulta la regeneració. També es poden introduir factors tròfics, però degut a que la resposta biològica a la lesió nerviosa respon a un complex patró de senyals, l'administració indiscriminada de factors tròfics no sembla una bona eina terapèutica a menys que el factor en qüestió tingui una activitat generalitzada sobre les diferents fases i elements de la regeneració (Thoenen 1991). Un altra opció assajada ha estat la introducció de segments de nervi dins de la llum tubular, per tal d'incrementar l'aport estructural necessari per la formació del cordó i la sustentació de la regeneració (Jenq i Coggeshall 1986; Rodríguez et al., 1999) o bé cèl·lules glials, en un intent de mimetitzar la composició d'un empelt nerviós. S'ha vist que el transplant de cèl·lules de Schwann incrementa el grau de regeneració assolit respecte la tubulització simple (Guénard et al., 1992; Keeley et al., 1993; Kim et al., 1994. Anselin et al., 1997; Levi et al., 1994, 1997; Rodríguez et al., 2000). No obstant, la immunocompatibilitat entre la cèl·lula transplantada i l'hoste és fonamental en l'eficàcia d'aquest mètode reparatiu (Guénard et al., 1992; Rodríguez et al., 2000).

MÈTODES PER PROMOURE LA REGENERACIÓ NERVIOSA

Qualsevol intervenció terapèutica en una lesió nerviosa ha d'anar encaminada a promoure la recuperació funcional, ja sigui facilitant la regeneració nerviosa o la ramificació col·lateral, com la correcte reinnervació dels òrgans diana. Per altra banda, la denervació crònica perjudica la posterior recuperació funcional, de manera que és important intentar

accelerar la regeneració axonal per tal d'escurçar el període de denervació. Per tant, paral·lelament als abordatges quirúrgics, s'ha plantejat la necessitat de l'administració coadjuvant de fàrmacs que poguessin accelerar o promoure la regeneració o la reinnervació en un intent de millorar els nivells de recuperació final assolits. Malauradament, encara no s'ha trobat un fàrmac adient per aplicar en humans, tot i els bons resultats que s'hagin pogut obtenir amb diferents teràpies en estudis experimentals. Un dels inconvenients de les teràpies assajades en models experimentals és la seva via d'aplicació. Així, els factors de creixement tenen una aplicació clínica molt limitada degut a la seva mala viabilitat oral, la manca de permeabilitat a la barrera hematoencefàlica i la necessitat, per tant, de ser aplicats tòpicament al focus de lesió. L'altre problema sol ser la seva toxicitat. Els gangliòsids, per exemple, han vist frenada la seva aplicació en humans pel risc a desencadenar la síndrome de Guillain-Barré (Schonhofer, 1991; Figueras et al., 1992). La nimodipina, per la seva part, si bé s'utilitza en clínica, no ha demostrat uns efectes proregeneradors prou convincents (Gispen et al., 1991; Angelov et al., 1996).

Una família de fàrmacs amb unes perspectives esperançadores en aquest sentit és la dels lligands d'immunofilines, que han mostrat propietats neurotròfiques i neuroprotectores en un variat nombre de models experimentals tant in vivo com in vitro. Els dos principals components d'aquesta família, la ciclosporina A (CsA) i l'FK506 o tacrolimus, s'utilitzen extensament en clínica humana com a supressors selectius de la immunitat cel·lular per tal de prevenir el rebuig d'òrgans sòlids després del seu transplantament. Són fàrmacs, per tant, que ja s'utilitzen en humans, si bé la seva acció immunosupressora sistèmica es converteix, inevitablement, en un efecte secundari a tenir en compte.

Els fàrmacs lligands d'immunofilines

El descobriment de la CsA, un pèptid cíclic derivat fúngic, va revolucionar el transplant d'òrgans sòlids, ja que va convertir-se en una alternativa molt menys tòxica als immunosupressors citotòxics. Posteriorment, es va aïllar d'un fong *Streptomyces* l'FK506 o tacrolimus, d'estructura macròlida. Més recent ha estat el descobriment de la rapamicina, d'estructura molt semblant a l'FK506. Aquests tres fàrmacs bloquegen la proliferació dels limfòcits T estimulada per antígens específics o per cèl·lules al·logèniques (revisió, Schreiber 1992). Els tres s'uneixen a unes proteïnes intracel·lulars, les immunofilines, i hi formen un complex a través del qual exerciran la seva acció farmacològica (veure més endavant).

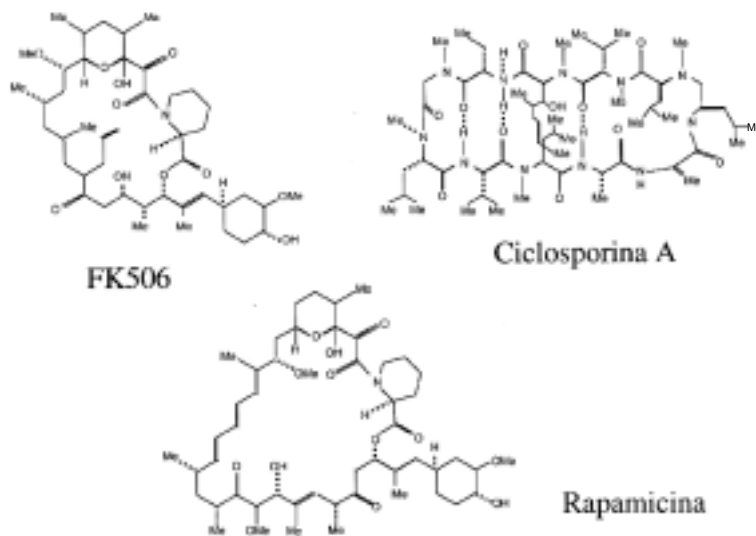


Fig 2. Estructura molecular dels fàrmacs lligands d'immunoflines. L'FK506 i la rapamicina són macròlids, mentre que la Ciclosporina A és un pèptid cíclic.

La seva activitat immunosupressora és independent de la seva activitat sobre el sistema nerviós, si bé el seu efecte dual podria ser molt interessant en situacions concretes, com la reparació de lesions nervioses mitjançant empelts d'origen al·logènic. En altres casos, per contra, l'efecte immunosupressor podria suposar un efecte secundari prou tòxic per limitar-ne el seu ús. Una estratègia encaminada a minimitzar els inconvenients d'aquests fàrmacs és la recerca de lligands d'immunofilines que mantinguin els efectes neurotròfics i/o neuroprotectors però que no siguin immunosupressors (Steiner et al., 1997a, Gold et al., 1997). Per altra banda, és important disposar d'estudis de dosi dependència per tal de reduir al màxim la toxicitat del tractament.

Les immunofilines

Les immunofilines són unes proteïnes citoplasmàtiques que tenen en comú la mateixa activitat enzimàtica, l'activitat prolil-peptidil isomerasa (PPIasa) o rotamasa (revisió de Schreiber, 1992). Se subdivideixen en dos grans subgrups, les ciclofilines (CyP) i les FKBP (FK506-binding protein), segons s'uneixin a la Ciclosporina A o a l'FK506 respectivament (revisions de Schreiber, 1991; Fruman et al., 1994; Hamilton i Steiner, 1998; Guo et al., 2001). Com que són proteïnes molt ubiqües, se les ha implicat en funcions biològiques molt generals, com el plegament i el transport de proteïnes i la formació de complexos proteics. Aquests proteïnes estan molt conservades al llarg de l'escala filogenètica, probablement degut a la seva capacitat d'actuar en condicions d'estrès cel·lular (revisió de Fruman et al 1994). Per altra banda, estableixen alguns canals de membrana (revisió de Snyder i Sabatini, 1992;

Marks et al., 1996). Així, l'FKBP-12 interacciona amb el receptor de la rianodina i el trifosfat d'inositol, dos canals de calci, i els dóna estabilitat tant en l'estat obert com tancat. Sembla que, unint-se al canal, faria de pont d'enllaç amb la calcineurina, que s'uniria al complex i modularia el flux de calci tot regulant la fosforilació del canal (Cameron et al., 1995ab). Pel mateix mecanisme (Wang et al., 1996) s'ha proposat que la FKBP-12 controlaria l'activitat del receptor del TGF β (*Transforming growth factor β*) (Wang et al., 1994).

Per una altra banda, la CyP D forma part de la matriu mitocondrial i s'associa a un canal dependent de voltatge que en condicions patològiques forma el MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*), implicat en la mort cel·lular mediada per calci (Crompton et al., 1999).

Algunes immunofilines formen part de complexos proteics, com els heterocomplexos dels receptors esteroidals. Tant la CyP40 com la FKBP-52 (també coneguda com a *heat shock protein 56*) s'hi associen (revisió de Pratt and Toft, 1997). Aquests complexos, formats per múltiples proteïnes *chaperones*, estabilitzaran el plegament del domini d'unió a l'hormona i sembla que estan implicats amb el transport citoplasma-nucli dels receptors esteroidals a través d'un transport dependent de microtúbuls. La unió de la dineïna, una proteïna motora, amb el complex, es faria a través de la FKBP-52. De manera paral·lela, en les neurones, aquesta immunofilina podrien intervenir en el transport retrògrad de proteïnes (Pratt et al., 2000).

Per tant, les immunofilines tindrien unes funcions molt generals en condicions fisiològiques i només la interacció amb un lligand exogen els permetria interferir en cascades de senyals intracel·lulars.

Acció immunosupressora dels lligands d'immunofilines

Se sap que les immunofilines responsables de mediar l'activitat immunosupressora de la CsA i l'FK506 són, respectivament, la CyP i la FKBP-12 dels limfòcits T. Els fàrmacs no n'alteraren la funció sinó que formen un complex i serà la geometria d'aquest complex i no pas la immunofilina implicada qui determinarà el mecanisme d'acció (Schreiber, 1991). Els fàrmacs tenen dos dominis d'unió, el que s'uneix a la immunofilina en el seu domini enzimàtic (rotamasa) i el domini efector, que mediarà les accions biològiques del complex immunofilina-fàrmac. Així, el complex CsA-CyPA, prendrà una configuració semblant al complex FK506-FKBP-12 i ambdós complexos interferiran sobre la calcineurina, una fosfatasa calci/calmodulina dependent (Liu et al., 1991; Schreiber and Crabtree, 1991). Quan

les cèl.lules presentadores d'antígens presenten un antígen estrany als limfòcits T, s'activa el seu receptor i hi ha una entrada de calci intracel·lular. El calci s'uneix a la calmodulina i la calcineurina B, que activaran l'activitat fosfatasa de la calcineurina A. Aquesta fosforil·larà el component citoplasmàtic del factor de transcripció nuclear de les cèl.lules T (NF-AT) i promourà la transcripció del gen de la IL-2 i del seu receptor (Crabtree, 1989). El bloqueig de la calcineurina per part del complex immunofilina-fàrmac comportarà, en darrer terme, la inhibició de la proliferació dels limfòcits T mediada per la IL-2 (Flanagan et al., 1991) (Fig. 3).

Altres indicis confirmen que no és la inhibició de l'activitat rotamàsica sinó la geometria del complex la que determina l'acció dels fàrmacs. Així, la rapamicina, un altre fàrmac del grup, d'estructura anàloga a la de l'FK506, amb qui comparteix la capacitat d'unió a les FKBP i que també n'inhibeix la seva capacitat rotamàsica de manera potent, no presenta el mateix mecanisme immunosupressor que aquest o que la CsA. Curiosament, altera la immunitat cel·lular en un punt més tardà del cicle, ja que el complex rapamicina-FKBP interacciona amb una altra proteïna, la RAFT (*rapamycin and FKBP target*) (Brown et al., 1995). El bloqueig d'aquesta proteïna, en últim terme, evita la proliferació dels clons de cèl.lules T estimulats per la IL-2 (Abraham i Wiederrecht, 1996, Schreiber, 1991) (Fig. 3).

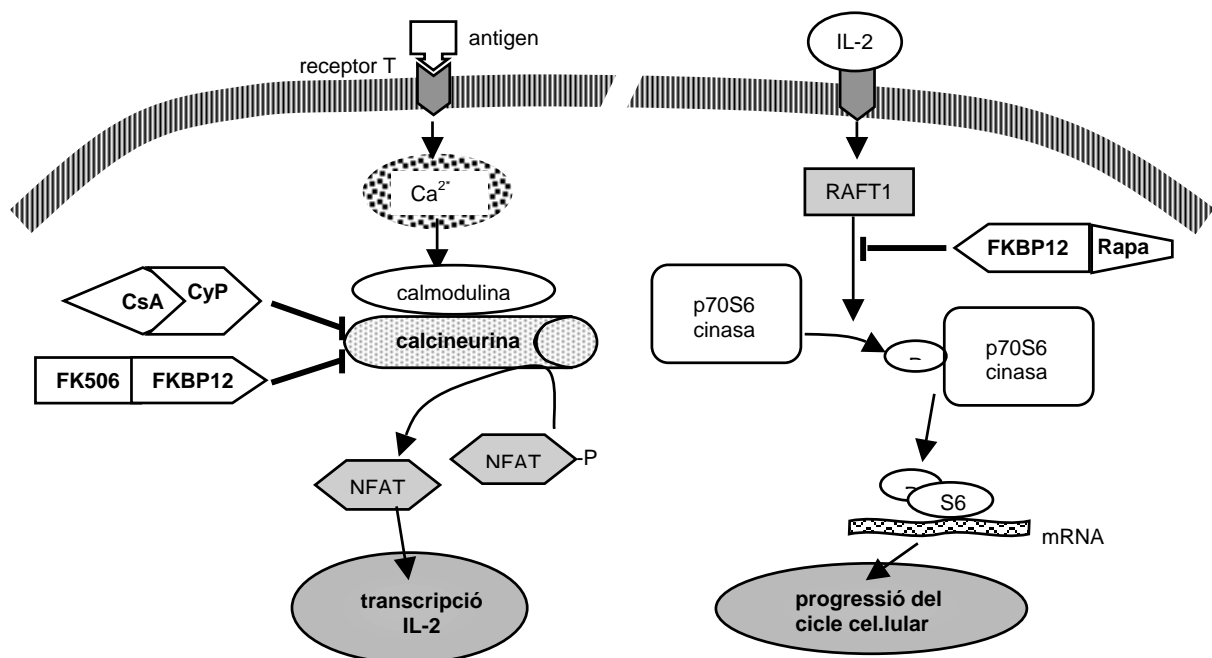


Fig 3. Esquema del mecanisme immunosupressor de la Ciclosporina A (CsA), l'FK506 i la rapamicina (rapa) en els limfòcits T activats.

Per altra banda, una molècula molt petita, la 506BD, que s'uneix a la rotamasa de la FKBP-12 però no posseeix el domini efector de l'FK506 no ha mostrat efecte immunosupressor (Bierer et al., 1990), si bé bloqueja els efectes dels fàrmacs quan s'administra conjuntament.

Per tant, sembla clar que l'acció immunosupressora d'aquests fàrmacs no ve determinada per la seva capacitat d'inhibir la rotamasa de les immunofilines, sinó per la configuració del complex que formen amb aquestes quan s'hi uneixen mitjançant, això sí, el domini rotamàsic. Pel mateix, els fàrmacs no inhibeixen les immunofilines sinó que, tot formant amb elles un complex, permeten que aquestes interaccionin amb altres blancs (Schreiber, 1991).

Efectes dels lligands d'immunofilines en el sistema nerviós

L'FK506 accelera la regeneració nerviosa després d'una lesió per aixafament (Gold et al., 1994, 1995) amb una corba dosi resposta en forma de campana, amb un pic màxim als 5 mg/kg/dia i una caiguda de l'eficàcia a dosis de 10 mg/kg (Wang et al., 1997). Per contra, cap estudi ha pogut demostrar que la CsA promogui la regeneració nerviosa (Wang et al., 1997, Lee et al., 2000). En lesions més greus, els efectes de l'FK506 no han estat tan clars. Així, després de la reparació mitjançant empelts autòlegs o isogènics, l'administració de dosis d'entre 0.3 i 1 mg/kg d'FK506 només acceleren l'inici de la recuperació locomotora, però els valors finals assolits són equivalents als dels animals no tractats (Doolabh et al., 1999; Fansa et al., 1999).

En cultius cel·lulars, l'FK506 promou també l'elongació de les neurites, si bé dins del rang de 1-10 nmol/l (Gold, 1997; Lyons et al., 1994, Chang et al., 1995). Dosis més elevades, de l'ordre de micromols (Chang et al., 1995) en acord amb les observacions in vivo (Wang et al., 1997), inhibeixen el creixement neurític, fet que suggereix que un excés de fàrmac inhibeix la seva pròpia acció neurotròfica. La CsA ha mostrat el mateix efecte a dosis més elevades (50 nmol/l) en alguns tipus neuronals, com cultius de neurones derivades de la cresta neural (Lyons et al., 1994), mentres que dosis de 1 µmol no s'han mostrat efectives en línies derivades del neuroblastoma humà (Gold 1997). Per altra banda, en cultius de neurones dopaminèrgiques, tant la CsA com l'FK506 promouen l'elongació, mentres que la rapamicina i un anàleg, el V-10,37, cap dels quals inhibeix la calcineurina, n'incrementa l'arborització. Curiosament, l'FK506, a dosis prou baixes per no promoure l'elongació neurítica mostra un efecte semblant a la rapamicina i el V-10,37 (Constantini et al., 2000).

En models in vitro, tan l'FK506 com la CsA inhibeixen la neurotoxicitat mediada per NMDA (Dawson et al., 1993). En accidents vasculars cerebrals, per contra, l'efecte neuroprotector d'aquests fàrmacs ha estat controvertit. En models d'oclusió vascular transitòria, els dos fàrmacs s'han mostrat efectius protegint el teixit cerebral en algun estudi (Butcher et al., 1997), si bé en un altre treball la CsA no ha mostrat cap efecte neuroprotector (Yagita et al., 1996). Però la limitada capacitat de la CsA de travessar la barrera hematoencefàlica (Begley et al., 1990) explicaria perquè aquest fàrmac no es mostra eficaç en tots els models de lesió cerebral. Així, una dosi prou elevada (Butcher et al., 1997) o la ruptura de la barrera hematoencefàlica (Uchida et al., 2003) serien fonamental perquè aquest fàrmac pogués ser efectiu. Per contra, en models d'isquèmia per hipoglucèmia (Friberg et al., 1998) o de contusió cerebral (Scheff et al., 1999), la CsA s'ha mostrat neuroprotectora, mentre que l'FK506 no ha mostrat efectes beneficiosos clars. Finalment, en clínica humana, els transplantats hepàtics amb tractament immunosupressor amb CsA han presentat una freqüència més elevada d'accidents isquèmics cerebrals globals que els tractats amb FK506 (Dawson, 1996). Si bé no pot descartar-se que la CsA provoqui més toxicitat que l'FK506, també existeix l'opció que l'FK506 estigui neuroprotegit. També hi ha indicis, si bé molt indirectes, de l'acció neuroregenerativa de l'FK506 en humans. S'està utilitzant amb èxit com a immunosupressor en el transplant al·logènic de mans en humans (Dubernard et al., 1999; Jones et al., 2000; Margreiter et al., 2002) i en un dels estudis (Dubernard et al., 1999) es va observar una evolució inesperadament ràpida del signe de Tinel (que permet valorar la progressió del front regeneratiu sensorial).

Immunofilines en el sistema nerviós

Si bé les immunofilines es van descobrir primer en el sistema immune, se sap que la seva concentració en el sistema nerviós és molt superior (Steiner et al., 1992). La localització regional de la FKBP12 presenta una distribució paral·lela a la de la calcineurina, fet que suggereix una relació funcional entre les immunofilines i la calcineurina. La relació d'aquesta proteïna amb l'alliberació de calci intracel·lular, en els processos de depressió a llarg terme en l'hipocamp, en la desensibilització dels receptors NMDA, en la regulació de la síntesi de l'òxid nítric i de la GAP-43 i en l'alliberació de neurotransmissors podrien explicar gairebé tots els efectes dels lligands d'immunofilines sobre el sistema nerviós. No obstant, molts estudis apunten a un mecanisme independent de la calcineurina per explicar els efectes neurotròfics i neuroprotectors d'aquests fàrmacs. Ja per començar, tal com s'ha descrit

anteriorment, hi ha molta controvèrsia sobre la qüestió de si tots els fàrmac comparteixen els mateixos efectes. Està clar que l'FK506 promou la regeneració nerviosa in vivo (Gold et al., 1994; 1995) mentres que cap estudi ha pogut demostrar aquest efecte en la CsA (Wang et al., 1997; Lee et al., 2000). In vitro, en canvi, alguns estudis equiparen els efectes dels dos fàrmacs en l'elongació de les neurites (Constantini et al., 2000). Per contra, altres anàlegs mostren uns efectes diferents, promovent la ramificació però no l'elongació (Steiner et al., 1997b; Constantini et al., 2000). Pel que fa al paper neuroprotector, els efectes de la CsA i l'FK506 in vitro són semblants en un model de neurotoxicitat per glutamat (Dawson et al., 1993) però hi ha més disparitat d'equivalències en les comparacions en models in vivo (Butcher et al., 1997; Yagita et al., 1996; Uchino et al., 1995), si bé cal tenir en compte que la CsA no travessa la barrera hematoencefàlica (Begley et al., 1900), a diferència de l'FK506, i que, essent unes deu vegades menys potent que aquest, demana una dosificació major. Finalment, en altres models de lesió cerebral, ha estat l'FK506 qui no s'ha mostrat neuroprotector, a diferència de la CsA. Sembla que, en aquests casos, l'efecte de la CsA seria mediat per la seva interacció amb una ciclofilina (la CyPD) que conforma el porus de transició mitocondrial (*mitochondrial transition pore*), fet que explicaria que es mostrés més eficaç que l'FK506 (Uchino et al., 2002).

La disparitat en les conclusions dels diferents estudis suggereix que no hauria un sol mecanisme d'acció que expliqués els diversos efectes dels fàrmacs sobre el sistema nerviós central. La inhibició de la calcineurina podria explicar alguns efectes comuns entre la CsA i l'FK506 i jugar algun paper en la neuroprotecció de diversos models d'isquèmia cerebral. No obstant, altres estudis proposen que l'efecte neuroprotector de l'FK506 seria calcineurina-independent i que demanaria la síntesi de novo d'ARN (Klettner et al., 2001) tot induint la resposta de les *heat shock proteins* (Klettner et al., 2003).

Tampoc sembla que la inhibició de la calcineurina sigui la responsable dels efectes neurotròfics de l'FK506. Per una part, la CsA no promou la regeneració en models in vivo, a diferència de l'FK506. Per altra banda, en neurones de ratolins KO per la FKBP-12, l'FK506 també promou el creixement de les neurites. Com a immunofilina alternativa a la FKBP-12 s'ha proposat la FKBP-52 (Gold et al., 1999a; Gold 2000; Gold i Villafranca 2003; Gold et al., en premsa), una proteïna associada amb el complex del receptor esteroïdal madur (revisió de Pratt i Toff, 1997). En cultius neuronals de neuroblastoma humà, l'addició d'FK506 i dexametasona tenia un efecte additiu en la potenciació de les neurites, però no quan s'administrava conjuntament amb el β -estradiol, fet que suggereix que tant l'FK506 com

l'estradiol promouen el trofisme neuronal a través del mateix receptor. En el mateix estudi, utilitzant bloquejants de la dissociació del receptor s'aconsegueix bloquejar l'efecte de l'FK506 i els estrògens, mentres que la translocació nuclear del receptor no sembla implicada en aquesta acció. Per altra banda, l'addició de l'anticòs contra la FKBP-52 al cultiu incrementa el creixement neurític més encara que si s'addiciona FK506. L'anticòs bloqueja tant l'efecte de la droga com el del NGF, fet que, unit a la capacitat de l'FK506 d'accentuar la sensibilitat de les cèl.lules al NGF (Lyons et al., 1996) suggereix que la cascada de senyals intracel.lular de neurotrofines i neuroimmunofilines podria convergir (Gold 2000, Gold i Villafranca, 2003) mitjançant la cascada raf-MEK-MAPK (raf –MAPK *kinase -mitogen-activated protein kinase*), una via important en el creixement neurític induït per factors neurotròfics (revisió de Kaplan, 2000).

Unint-se a l'FKBP-52, l'FK506 desagregaria el complex del receptor esteroide i alliberaria els seus components (diverses *chaperones*: la hsp90, la p23 i la immunofilina) (Pratt i Toft, 1997) que comportaria un increment de la regeneració axonal. L'activitat neurotròfica de l'FK506 és dependent de l'activació de l'ERK, un membre de la família de les MAPK, però no està clar quin és l'element activador responsable. La hsp90 juga un paper clau en l'activació de les ERK per la MEK induïda pels estrogens en cervell (Setalo et al., 2002). Per altra banda, el grup de BG Gold (Gold i Zhong, en premsa) també ha demostrat que la p23 pot activar l'ERK, de manera que aquesta molècula sembla ser un element clau en la regeneració nerviosa i l'elongació de les neurites mediada per aquest complex. Curiosament, l'activació de l'ERK per la p23 és dependent de FK506 però independent de NGF. Potser la p23 activa directament les ERK, independentment de la hsp90, o potser ho fa mitjançant la seva interacció amb la hsp90. Tampoc estan clar els darrers mediadors de l'efecte neurotròfic de l'FK506, si bé se sap que comporten un increment de l'expressió de c-jun (Gold et al., 1999a) i GAP-43, (Gold et al., 1998). Finalment, l'FKBP52 podria interaccionar amb elements del citoesquelet i promoure també la regeneració (Gold et al., 1999a). La capacitat d'aquesta immunofilina d'unir-se a la dineïna, una proteïna motora (Pratt et al., 2000) podria permetre a l'FK506 interferir en el transport axonal. (més detalls a *Probable mecanisme d'acció de l'FK506 sobre la regeneració*, Discussió).

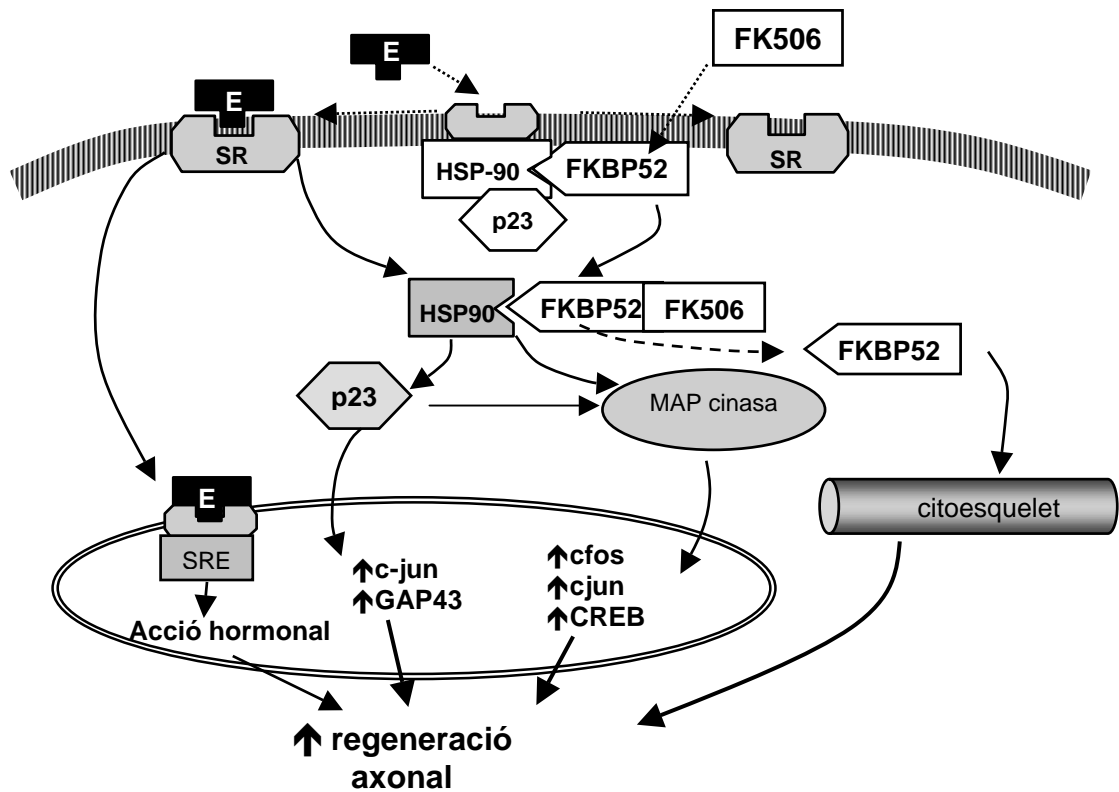


Fig 4. Mecanismes d'acció, mediat per l'activació del complex receptor esteroide i la FKBP52, que poden promoure efectes neurotròfics i la regeneració axonal (modificat de Gold et al 1999a). El complex receptor esteroide està format per les chaperones hsp90, p23 i una immunofilina, com la FKBP52 (revisió de Pratt i Toft, 1997). La hsp90 s'uneix al component d'unió de l'hormona esteroidal (SR en l'esquema), mentre que la p23 ajuda la hsp90 a mantenir una conformació amb alta afinitat per l'hormona. Quan l'hormona (E: Estrogen) s'uneix al SR, les chaperones s'alliberen. La FKBP52 podria interaccionar amb elements dels citoesquelet, mentre que la hsp90 pot activar la cascada de les MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Pratt i Toft, 1997; Setalo et al., 2002)). La p23 també pot activar aquesta via i es proposa com un element clau en l'elongació nerviosa i la regeneració (Gold i Zhong, en premsa).

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball consisteix a investigar estratègies farmacològiques, en particular mitjançant l'administració d'FK506, per millorar la regeneració nerviosa i la recuperació funcional després de lesions del nervi perifèric. Amb aquest propòsit, s'han plantejat els següents objectius específics:

1) Desenvolupar un model experimental per l'avaluació detallada i quantitativa dels efectes promotors de la regeneració nerviosa de l'FK506:

- Avaluar la taxa de regeneració i de reinnervació de diferents tipus d'axons: motors, sensorials i autonòmics, en el mateix model animal, el nervi ciàtic del ratolí, subjecte a diversos tipus de lesions traumàtiques i reparacions.
- Comparar el grau de recuperació funcional assolit, estudiat amb tècniques neurofisiològiques, amb el nombre d'axons regenerats i reinnervants, quantificats per tècniques morfològiques.

2) Estudiar la relació dosi-efecte del tractament amb FK506 sobre la taxa i l'eficàcia de la regeneració axonal:

- Mesurar la velocitat de regeneració després de l'axotomia per compressió del nervi ciàtic del ratolí, comparant-la amb la progressió de la reinnervació de teixits perifèrics.
- Valorar dins de quin rang de dosis l'FK506 promou la regeneració del nervi ciàtic en el ratolí i quina és la dosi més eficaç.
- Valorar l'efecte de diferents dosis d'FK506 sobre la reinnervació, mitjançant la regeneració nerviosa i la ramificació col·lateral.

3) Investigar els efectes promotors de la regeneració de l'FK506 en lesions greus del nervi perifèric:

- Avaluar els efectes de l'administració d'FK506 en reseccions del nervi ciàtic del ratolí reparades per diferents mètodes quirúrgics convencionals: utilitzant un autoempelt o una guia neural sintètica.
- Valorar si l'administració contínua d'FK506 es mostra més eficaç en la promoció de la regeneració que l'administració discontinua en reseccions reparades.

4) Valorar l'efecte de l'administració d'FK506 sobre la regeneració en lesions nervioses severes del nervi ciàtic del ratolí reparades mitjançant empelts nerviosos al·logènics:

- Determinar la dosi adequada de l'FK506 per evitar el rebuig de transplants nerviosos d'origen al·logènic o xenòleg.
- Comparar si els resultats obtinguts amb al·loempelts són equivalents als que s'assoleix mitjançant la reparació per autoempelts,
- Valorar l'efecte de l'administració discontinua d'FK506 sobre la regeneració en lesions nervioses reparades mitjançant al·loempelts

5) Investigar l'efecte de l'FK506 sobre la regeneració en lesions nervioses severes del nervi ciàtic del ratolí reparades mitjançant guies neurals i pròtesis cel·lulars:

- Valorar l'efecte de l'FK506 en reseccions reparades mitjançant tubs de silicona i tubs de col·lagen.
- Estudiar l'ús de transplants de cèl·lules de Schwann d'origen al·logènic, aïllades prèviament en cultiu, per promoure la regeneració en pròtesis cel·lulars, en combinació amb l'administració d'FK506.

DISSENY EXPERIMENTAL

Model experimental

Per tal d'estudiar la regeneració nerviosa perifèrica s'ha utilitzat el model del nervi ciàtic de ratolí OF-1. El nervi ciàtic prové del plexe lumbo-sacre (constituït principalment per les arrels L4-L5-L6), entra a l'extremitat posterior a través de la fenedura ciàtica, descendeix per la part posterior de la cuixa i a nivell de la fossa poplítica es divideix en dues branques terminals, els nervis tibial i peroneal comú. Una branca de cada nervi s'uneix per formar el nervi sural, de component principalment sensorial. La branca tibial continua per la part posterior de la cama a nivell profund. A nivell del turmell és superficial i se situa posterior al maleol intern, abans de ramificar-se en les seves branques terminals, els nervis plantars medial i lateral. En el seu trajecte innerva els músculs del compartiment posterior de la cama, així com la majoria de músculs intrínsecs del peu, i és responsable de la innervació cutània de gairebé tota la planta del peu. El nervi peroneal és menor que el tibial i descendeix per la part lateral externa de la cama. Innerva els músculs del compartiment anterolateral de la cama, així com la pell d'aquella zona i la del dors del peu.

El nervi safè, de recorregut anterior, és una branca del nervi femoral que innerva la cara interna de la cama i la zona medial del peu (primer i segon dit, amb certa variabilitat), solapant-se parcialment amb el nervi ciàtic. Pel mateix, sempre que s'ha volgut valorar la capacitat regenerativa del nervi ciàtic, s'ha optat per eliminar el nervi safé, mitjançant la seva resecció àmplia a nivell mig de la cuixa, per tal de no tenir interferències en les proves funcionals realitzades a la planta del peu.

Lesions nervioses i reparacions

S'han utilitzat dos models de lesió:

1. Lesió lleu, amb bona recuperació funcional per se, sense necessitat de reparació quirúrgica (axonotmesis): aixafament del nervi ciàtic
2. Lesió severa, sense recuperació funcional si no es repara quirúrgicament: resecció àmplia del nervi ciàtic i posterior reparació.

Els mètodes de reparació emprats en les lesions de resecció han estat:

- Empelt nerviós d'origen autòleg (del propi individu; en aquest cas, el propi segment resecat)

- Empelt nerviós al·logènic (d'un altre individu) o xenòleg (d'un individu d'una altra espècie, en aquest cas la rata)
- Tubulització amb tubs de silicona o de col·lagen.

Resum del disseny experimental dels treballs desenvolupats per assolir els objectius previs:

1. Desenvolupar un model experimental per a l'avaluació detallada i quantitativa dels efectes promotors de la regeneració nerviosa de l'FK506

1.1-Comparant els efectes sobre diferents lesions i mètodes reparatius:

-Aixafament del nervi ciàtic (Treball 1 i 2)

-Resecció de 6mm del nervi ciàtic i reparació mitjançant:

Autoempelt: AG (Treball 1), AutoG (Treball 4)

Al·loempelt: AlloG (Treball 4, 5 i Addenda)

Tub de silicona: SIL (Treball 3 i Addenda)

Tub de col·lagen: C (Treball 6)

Tub de col·lagen amb cèl·lules de Schwann: SC (Treball 6)

1.2-Avaluació de la recuperació funcional dels diferents tipus de fibres mitjançant:

-Tècniques neurofisiològiques (Treball 2, 3, 5, 6 i Addendes)

Estudis de conducció motora i sensorial (estudi axons motors i sensorials)

Tècnica del motlle de silicona (estudi axons sudomotors)

Test del pin prick (estudi axons nociceptius)

-Tècniques morfològiques

Recompte axons mielínics regenerants (Treballs 2-6 i Addendes)

Recompte axons amielínics (Treball 2 i 4)

Estudi de la reinnervació dels òrgans diana per immunohistoquímica (Treball 2)

2- Estudiar la relació dosi-efecte del tractament amb FK506 sobre la taxa i l'eficàcia de la regeneració axonal:

2.1- Dosi-dependència de l'FK506 en la promoció de la taxa de regeneració (Treball 1):

Model experimental: Aixafament del nervi ciàtic

Grups experimentals (valoració de la taxa entre 2 i 7 dies postlesió)

FK0.2: 0.2 mg/kg FK506 sc

FK0.5: 0.5 mg/kg FK506 sc

FK1: 1 mg/kg FK506 sc

FK5: 5 mg/kg FK506 sc

FK10: 10 mg/kg FK506 sc

FK0: volum equivalent de sèrum fisiològic sc

2.2- Estudi de la capacitat de diferents dosis d'FK506 de promoure la regeneració i la reinnervació col·lateral (Treball 2)

2.2a. Per valorar la regeneració nerviosa

Model experimental

Aixafament del nervi ciàtic. Resecció àmplia del nervi safè.

Grups experimentals (31 dies de seguiment)

FK506 0.2: 0.2 mg/kg FK506 sc

FK506 5: 5 mg/kg FK506 sc

C: volum equivalent de solució salina sc

2.2b. Per valorar la ramificació col·lateral (del nervi safè quan es lesiona el nervi ciàtic)

Model experimental

Resecció del nervi ciàtic. Nervi safè intacte

Grups experimentals (21 dies de seguiment)

FK506 0.2: 0.2 mg/kg FK506 sc

FK506 5: 5 mg/kg FK506 sc

C: volum equivalent de solució salina sc

3. Investigar els efectes promotors de la regeneració de l'FK506 en lesions greus del nervi perifèric:

Model experimental

Resecció de 6 mm del nervi ciàtic

Reparació mitjançant un empelt nerviós autòleg (AG, autoG) o un tub de silicona (SIL)

3.1- Comparació de l'ús d'autoempelts i guies neurals sintètiques (Treball 3)

Grups experimentals (120 dies seguiment)

AG: reparació mitjançant un autoempelt

AG+FK: +5 mg/kg FK506 sc durant 35 dies i reducció a 3 mg/kg fins dia 65.

SIL: reparació mitjançant un tub de silicona

SIL+FK: +5 mg/kg FK506 sc durant 35 dies i reducció a 3 mg/kg fins dia 65.

3.2 –Comparació entre una pauta de tractament contínua i discontinua d'FK506 (Treball 4, Addenda al Treball 3)

Grups experimentals (120 dies seguiment)

AutoG+FK506 continuous: autoempelt + 5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies.

AutoG+FK506 discontinuous: + 5 mg/kg FK506 sc 35 dies i 3mg/kg/dia fins a 65dpo

SIL+FK continuous: Tub Silicona + 5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies.

SIL+FKdiscontinuous: + 5 mg/kg FK506 sc durant 35 dies i 3mg/kg/dia fins a 65dpo

4. Valorar l'efecte de l'administració d'FK506 sobre la regeneració en lesions nervioses severes del nervi ciàtic del ratolí reparades mitjançant empelts nerviosos al·logènics:

Model experimental

Resecció de 6 mm del nervi ciàtic. Reparació mitjançant empelts de diferents orígens.

4.1. Determinació de la dosi immunosupressora (Treball 4)

Grups experimentals (21 dies de seguiment)

Autograft: reparació mitjançant autoempelt

Allograft: reparació mitjançant al·loempelt

Allograft+FK506 0.2: al·loempelt + 0.2 mg/kg d'FK506 sc

Allograft+FK506 2: al·loempelt + 2 mg/kg d'FK506 sc

Allograft+FK506 5: al·loempelt + 5 mg/kg d'FK506 sc

Xenograft: reparació mitjançant xenoempelt

Xenograft+FK506 5: xenoempelt + 5 mg/kg d'FK506 sc

4.2. Comparació dels resultats obtinguts entre al·loempelts i autoempelts (Treball 5)

Grups experimentals (120 dies de seguiment)

AutoG (AG en Treball 3): reparació mitjançant autoempelt

AutoG+FK506 continuous: AutoG +5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies

AlloG: reparació mitjançant al·loempelt

AlloG+FK506 continuous: AlloG +5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies

4.3. Estudiar l'efecte de l'administració discontinua d'FK506 sobre al·loempelts:

Grups experimentals

(Treball 5) (120 dies seguiment)

AlloG: reparació mitjançant al·loempelt

AlloG+FK506 discontinuous: AlloG +5 mg/kg FK506 sc 35 dies i 3mg/kg/dia fins als 65 dpo

(Addenda al Treball 5) (270 dies seguiment)

AlloG9m: reparació mitjançant al·loempelt i seguiment durant 270 dies

AlloG9m+FK: AlloG+5 mg/kg FK506 sc durant 35 dies i 3mg/kg/dia fins als 65 dpo

5. Investigar l'efecte de l'FK506 sobre la regeneració en lesions nervioses severes del nervi ciàtic del ratolí reparades mitjançant guies neurals i pròtesis cel·lulars:

Model experimental

Resecció de 6 mm del nervi ciàtic.

Reparació mitjançant una guia neural:

de silicona (SIL)

de col.lagen (C)

de col.lagen plena de cèl.lules de Schwann al·logèniques (SC).

Grups experimentals (120 dies de seguiment)

(Addenda al Treball 3)

SIL: reparació amb un tub de silicona

SIL+FK continuous: SIL +administració 5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies.

(Treball 6)

C: reparació amb un tub de col.lagen plena de sèrum fisiològic

C+ FK: C+administració 5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies

M: reparació amb una guia de col.lagen amb matrigel

SC: reparació amb una guia de col.lagen amb matrigel i cèl.lules de Schwann al·logèniques.

SC+FK: SC +administració 5 mg/kg FK506 sc durant 120 dies

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els resultats obtinguts en aquest estudi mostren que l'administració d'FK506 accelera la taxa de regeneració axonal després de lesions del nervi perifèric i millora el grau de reinnervació assolit. L'estudi de dosi-resposta demostra dos pics de màxim efecte de l'FK506 sobre la velocitat de regeneració, a 0.2 i 5 mg/kg, si bé la dosi de 5 mg permet assolir uns millors nivells de recuperació funcional en seguiments llargs que la dosi de 0.2 mg/kg. No obstant, les dues dosis incrementen la reinnervació dels òrgans diana i la regeneració axonal en proporcions similars. En lesions severes per resecció d'un segment del nervi, on la reparació quirúrgica és determinant per l'èxit de la regeneració, els efectes de l'administració de l'FK506 depenen del tipus de mètode reparatiu utilitzat. Així, en les reseccions reparades mitjançant un autoempelt, on la regeneració és bona per se, l'FK506 només accelera lleugerament el dia d'inici i el grau màxim de recuperació assolit després de 4 mesos. Quan s'utilitza un empelt al·logènic, l'administració contínua d'una dosi immunosupressora d'FK506 permet evitar el rebuig i igualar l'eficàcia d'aquests empelts amb els d'origen autòleg. Per altra banda, en les reseccions severes reparades mitjançant tubs de silicona, on la regeneració és molt limitada, l'administració d'FK506 no permet incrementar el pobre percentatge d'èxit en la reinnervació. Per contra, quan s'utilitza un tub de col·lagen, un model intermig, els efectes de l'administració de l'FK506 són molt més marcats i incrementen tant el percentatge d'èxit en la regeneració com la velocitat i la recuperació funcional final. En la reparació per guies de col·lagen amb cèl·lules de Schwann al seu interior, un model de pròtesi cel·lular que intenta remedar l'ambient que subministra un empelt nerviós, l'administració d'FK506 garanteix l'èxit de la reinnervació en tots els casos, si bé el grau de recuperació final assolit als 4 mesos és inferior a l'obtingut amb la interposició d'autoempelts.

Relació dosi-efecte de l'FK506

Després de l'aixafament del nervi ciàtic, l'FK506 accelera la regeneració axonal depenent de la dosi a la qual s'administri. La millor taxa de regeneració s'obté amb la dosi de 5 mg/kg, encara que les dosis de 0.2 i 2 mg/kg donen unes taxes molt semblants. A elevades dosis es perd l'efecte, a l'igual que a dosis intermitges, sobretot a la d'1 mg/kg. En el model de rata, un estudi previ descriu una resposta dosi efecte en forma de campana, dins del rang de 1-10 mg/kg, amb un pic de màxim efecte també a la dosi de 5 mg/kg i una caiguda a 10 mg/kg (Wang et al., 1997). L'única diferència remarcable és que la dosi d'1 mg/kg ha mostrat certa eficàcia en la rata (Gold et al., 1995; Wang et al., 1997), però no en el ratolí.

Aquesta discrepància pot ser deguda a les diferències farmacocinètiques entre espècies, així com a les diferències metodològiques entre estudis. Així mateix, en el nostre primer treball, valoràvem la progressió del front regeneratiu mitjançant pinçament directe del nervi durant la primera setmana post-lesió. No obstant, en un seguiment més llarg (Treball 2), d'un mes, on hem pogut valorar la reinnervació distal, s'ha mostrat clarament més efectiva la dosi de 5 mg/kg que la de 0.2, tant en l'acceleració de la reinnervació com en la recuperació final assolida, si bé els valors obtinguts en els animals tractats sempre han estat millors que en els no tractats. De totes maneres, si bé els valors funcionals de la dosi de 0.2 mg/kg no eren tan bons com els obtinguts amb la dosi més alta, el nombre d'axons amielíncics al final del seguiment i el percentatge de reinnervació distal, tant a nivell de les glàndules sudorípares com en epidermis era molt semblant a l'assolit amb la dosi de 5 mg/kg i marcadament superior que en el grup no tractat.

Curiosament, *in vitro*, dosis diferents d'FK506 mostren comportaments diferents. Així, una dosi molt alta, de l'ordre de μ mols, es mostra inhibidora del creixement neurític que, en canvi, s'accentua amb l'administració dins d'un rang de dosis de 1-10 nmolar. Dosis més baixes, que no tenen la capacitat de potenciar l'elongació de les neurites, promouen la ramificació d'aquestes (Constantini et al., 2000; Steiner et al., 1997).

Per altra banda, la dosi de 0,2 mg/kg tot i exercir acció neurotròfica, no és suficient per evitar el rebuig d'empelts nerviosos d'origen al·logènic. La dosi de 2 mg/kg, només es mostra parcialment efectiva, mentre que la de 5 mg/kg permet garantir la immunoacceptació en empelts tant d'origen al·logènic com xenòleg. Per tant, i en acord amb les evidències que deslliguen la calcineurina dels efectes neurotròfics de l'FK506 (Gold et al., 1997; 1999; Steiner et al., 1997 a,b), l'efecte immunosupressor i l'efecte sobre la regeneració es mostren independents. Pel mateix, sembla lògic considerar una bona alternativa la recerca d'anàlegs no immunosupressors de l'FK506 que mantinguin els seus efectes neurotròfics (Gold et al., 1997; Steiner et al., 1997 a,b) per tal de poder-los utilitzar com a promotors de la regeneració en lesions nervioses que no demanin reparació (com l'aixafament d'un nervi) o que no siguin reparades mitjançant transplants al·logènics i, per tant, on sigui innecessària una acció immunosupressora.

Efectes de l'FK506 en lesions nervioses lleus

En acord amb estudis previs (Gold et al., 1994, 1995; Lee et al., 2000, Wang et al., 1997), hem vist (Treballs 1 i 2) que l'administració d'FK506 accelera la taxa de regeneració

axonal i la progressió temporal de la reinnervació. En aquells estudis només es descriu una millor funció (mitjançant el test del *walking track*) i un nombre més gran d'axons mielínics a meitat del seguiment, però el grup no tractat s'acaba igualant amb el tractat en el temps. No obstant, l'ús de tècniques més fines per valorar la recuperació funcional, mitjançant tècniques neurofisiològiques (Navarro et al., 1994) i un estudi immunohistoquímic de la reinnervació de la pell plantar (Navarro et al., 1997, Verdú i Navarro., 1997), permet discriminar millor els efectes del fàrmac. Així, en el treball 2 es pot veure com l'FK506, un mes després de la lesió per aixafament, ha permès una reinnervació de la pell plantar i de les glàndules sudorípares de la planta del peu significativament superior a la que han assolit els animals no tractats. Aquesta espectacular millora pot ser deguda a la capacitat de l'FK506 de promoure de manera molt marcada la regeneració dels axons amielínics, però també de promoure la ramificació terminal i la reinnervació dels òrgans diana.

Les diferències funcionals assolides pels axons sudomotors o nociceptius són mínimes en comparació amb les que s'observen per immunohistoquímica, però cal tenir en compte que aquests axons tenen una gran capacitat de reinnervar funcionalment (Navarro et al., 1994, 2001; Verdú and Navarro, 1997). Si es mira de manera global la recuperació funcional final, es pot veure que l'administració de 5 mg/kg d'FK506 durant un més permet assolir una recuperació dels 65%, davant del 57% que assoleix el grup sense tractament. La millora és, si bé significativa, molt limitada, de manera que pot ser discutible l'administració d'un fàrmac tan tòxic com l'FK506 per obtenir només una lleu millora en un tipus de lesió que, per se, permet assolir uns resultats funcionals acceptables.

Efectes de l'FK506 en lesions nervioses severes (reseccions)

Reparació per empelts

L'autoempelt és el mètode de reparació estàndard en la reparació de reseccions nervioses, degut als bons nivells de recuperació funcional que permet assolir. No obstant, en aquest treball hem utilitzat sempre l'autoempelt ideal (el mateix segment resecat), tot i que en humans sempre s'ha de recórrer a altres nervis, amb el consegüent desequilibri en el calibre de l'empelt i el nervi a reparar, fet que pot empitjorar la recuperació funcional.

Després de quatre mesos, un autoempelt de 6 mm en el nervi ciàtic del ratolí ha permès recuperar la funció global en un 67%. L'administració d'FK506 permet incrementar el percentatge de recuperació fins a un 75% (Treball 5). A l'igual que succeeix en les lesions lleus, els efectes de l'FK506 permeten incrementar el grau de recuperació final assolit però de

manera lleu. De nou, sembla discutible administrar un fàrmac potencialment tòxic en una situació que, sense tractament coadjuvant, permet assolir uns resultats funcionals prou bons. Per contra, l'ús d'aquest agent estaria plenament justificat en situacions on fos necessari el seu efecte immunosupressor, com en l'interposició d'empelts al·logènics. En el treball 5 queda patent que l'administració contínua d'una dosi immunosupressora d'FK506, de 5 mg/kg/dia, evita el rebuig dels transplants i permet que els al·loempelts sostinguin la regeneració amb la mateixa eficàcia que els autoempelts.

Tubulització nerviosa

Quan s'utilitza la tubulització per tal de reparar reseccions severes, la recuperació funcional és molt més pobre. Reseccions de 6 mm en el ratolí o de 12 mm en la rata no es consideren subsidiàries de ser reparades mitjançant tubs de silicona o similars, degut al limitat percentatge d'èxit en la regeneració que permeten assolir. L'ús d'altres materials, com les guies de col·lagen, permet incrementar lleugerament el nombre d'animals amb reinnervació distal, però el grau de recuperació funcional continua sent molt inferior al que s'assoleix mitjançant empelts nerviosos (Treball 6).

	Autoempelt	Tub silicona	Tub col.lagen
Recuperació màxima (%)	66.8±3.1	7.5±3.4 ^a	9.2±4.1 ^a
Percentatge èxit (%)	100	20	30

P<0.05 vs Autoempelt^a

L'administració d'FK506 en el model de resecció reparada mitjançant tub de silicona (Addenda al Treball 3) no permet incrementar el percentatge d'animals que aconsegueixen reinnervar, si bé els que ho fan, presenten un grau de recuperació funcional (55% de mitjana) i un cordó regeneratiu molt més consistent (al voltant de 1300 fibres mielíniques a nivell distal) que en els animals no tractats (només assoleixen un 27% de recuperació i unes 120 fibres mielíniques a nivell distal).

Com a condició prèvia perquè es doni la regeneració a través de guies neurals, cal que es formi un cable de fibrina a través del qual migren les cèl·lules de Schwann i els fibroblasts dels extrems nerviosos. En els empelts, en canvi, l'empelt degenerant ja és un bon substrat i la regeneració no es veu retardada, fet que explica perquè la reinnervació és més precoç en les reparacions reparades mitjançant empelts que mitjançant guies. La formació d'aquest cable, que oferirà un bon substrat perquè els axons creixin (Williams et al 1983), serà determinant

per l'èxit de la reinnervació. I com més llarga sigui la distància entre els dos extrems, més difícil és la formació d'aquests. La limitada capacitat de les cèl.lules de Schwann de migrar (Hall et al., 1986 ab) també resultarà determinant i explica la incapacitat de les guies de sostenir la regeneració a través de distàncies llargues.

Per tant, l'FK506 té la capacitat d'accelerar la regeneració nerviosa, com han mostrat estudis previs (Gold et al., 1994; 1995), i el grau de reinnervació dels òrgans diana (com es demostra en el treball 2), però no sembla capaç d'evitar el fracàs de la regeneració en un ambient pobre. S'ha vist que l'FK506 no aconsegueix potenciar la regeneració axonal en nervis crònicament denervats (Sulaiman et al., 2002), ja que no pot compensar un ambient pobre que sostingui la regeneració. Així, l'FK506 no és capaç de promoure el cable que ha d'unir els dos extrems nerviosos dins del tub com a condició prèvia perquè es dongui la regeneració.

Per contra, se sap que les guies fetes de materials reabsorbibles sustenten millor la regeneració que no pas els tubs de silicona (Chamberlain et al., 1988; Navarro et al., 1996; Valero-Cabré et al., en premsa), probablement degut a la seva major capacitat d'aportar nutrients als axons regeneratius, de potenciar la formació de la matriu i del cable inicial. Aquest aport seria crucial en distàncies llargues, on els extrems no són capaços de formar un cable per si sols. En aquesta situació, l'administració d'FK506 permet assolir un notable percentatge d'èxit en la regeneració, com ho demostra el marcat increment en l'èxit de la regeneració en les reseccions reparades amb tubs de col.lagen en el grup d'animals tractats respecte els no tractats (Treball 6).

	Silicona	Silicona+FK506	Col.lagen	Col.lagen+FK506
% Resposta màxima	7.5±3.4	11.8±7.9	9.2±4.1	22.3±8.1 ^a
% èxit reinnervació	17%	20%	44%	73%

P<0.05 VS^a Silicona

Quan els tubs de col.lagen s'omplen de cèl.lules de Schwann, s'està afavorint un ambient més propici per la regeneració, com ho demostra la major capacitat d'aquests implants de sustentar la regeneració (Guénard et al., 1992, Keeley et al., 1993, Kim et al., 1994, Anselin et al., 1997, Levi et al., 1994, 1997, Rodríguez et al., 2000). La presència de cèl.lules glials facilita la formació del cordó regeneratiu i, pel mateix, incrementa el percentatge d'èxit en la regeneració. No obstant, és important la immunocompatibilitat entre

les cèl.lules transplantades i l'hoste (Guénard et al., 1992; Rodríguez et al., 2000). En el nostre estudi (Trellat 6), l'addició de cèl.lules al·logèniques barrejades amb matrigel permet assolir uns nivells funcionals lleugerament superiors als que obtenim introduint només matrigel. En canvi, la combinació de cèl.lules de Schwann al·logèniques amb l'administració sistèmica d'FK506 permet garantir la reinnervació en tots els animals, assolint un grau de recuperació funcional molt superior al que s'obté amb la tubulització simple.

L'efecte immunosupressor de l'FK506 explica, en part, que el transplant amb cèl.lules al·logèniques sigui millor que en el grup no tractat. Però altres estudis on utilitzaven la tubulització amb cèl.lules gials autogèniques en distàncies limitants, de 10 mm en la rata (Keeley et al., 1993) o 6 mm en el ratolí (Rodríguez et al., 2000), només han obtingut un èxit en la regeneració del 78% i del 87% respectivament.

Administració contínua o discontinua d'FK506

En un model d'aixafament del nervi ciàtic en la rata (Gold et al., 1999b) està demostrat que l'administració contínua d'FK506 durant els 18 dies que dura el seguiment es mostra més efectiva que l'administració temporal (ja sigui durant els primers nou dies després de la lesió o si s'administra amb retràs, a partir de la segona meitat del període de seguiment) en la promoció de la regeneració. No obstant, no hi ha estudis que valorin l'eficàcia de tractaments més llargs en lesions més severes, amb una evolució més lenta que les axonotmesis. I degut a l'elevada toxicitat de l'FK506, sobretot lligada al seu efecte immunosupressor, és important valorar si un tractament llarg portarà beneficis respecte a un tractament més limitat. Els valors obtinguts en els autoempelts seguits durant quatre mesos i tractats tot el període o només les 9 primeres setmanes no semblen justificar un tractament perllongat, al contrari. A partir dels 100 dies, alguns animals comencen a presentar certa toxicitat i els valors finals de recuperació obtinguts amb el grup tractat contínuament amb una dosi de 5 mg/kg/dia no superen els que obté el grup que només va rebre el fàrmac durant nou setmanes i a una dosi decreixent (Trellat 5). No obstant, en els autoempelts, els animals comencen a tenir reinnervació al voltant dels 30 dies, i entren en fase de replà per les funcions nociceptives i sudomotores al voltant dels 60 dies, quan se'ls retira el tractament, fet que podria explicar la manca d'efecte d'una administració més continuada. Per contra, quan s'interposa una guia neural, la regeneració és una mica més lenta i, pel mateix, podria ser més determinant la durada del tractament. Però quan es comparen els resultats obtinguts amb animals que van ser tractats contínuament o només durant les 9 primeres setmanes després de

patir una resecció del ciàtic i reparar-la mitjançant un tub de silicona (Addenda al Treball 3), no es troben diferències. L'administració contínua no permet incrementar el percentatge d'èxit en la regeneració (del 20% en els dos casos) ni el grau de recuperació final assolit.

Reparació	Durada tractament	Proporció reinnervats	% recuperació final	IRF global	Nº axons mielínics (distal)
Autoempelt	65 d	6/6	74.4±0.6	5323±118	3130±310
	120 d	8/8	65.6±4.8	4876±355	3034±298
Tub silicona	65 d	1/5	19.9±15.4 ^{ab}	1108±802	388±388 ^{ab}
	120 d	2/10	11.8±7.9 ^{ab}	779±516 ^{ab}	320±210 ^{ab}

P<0.05 autoempelt 65d^a, 120d^b

Per tant, en els tipus de reparacions on no és necessari un efecte immunosupressor, sembla raonable optar per un tractament durant un període curt o també per dosis més baixes però igualment efectives per promoure la regeneració i la reinnervació dels òrgans diana. Per contra, en els casos on s'utilitza material d'origen al·logènic, l'abordatge del tractament ha de ser diferent. Per una banda, s'ha d'utilitzar una dosi efectivament immunosupressora. Per altra banda, cal valorar els riscos de la interrupció del tractament. En la literatura hi ha molta controvèrsia sobre els efectes de la retirada de la immunosupressió sobre empelts al·logènics ben tolerats per l'hoste (Yu et al., 1989; Zalewski and Gulati 1981; Midha et al., 1993 a; Büttemeyer et al., 1995). Diversos estudis que han utilitzat la CsA o l'FK506 com a fàrmacs immunosupressors, descriuen el rebuig i pèrdua funcional després de la retirada del tractament, però en alguns casos amb una recuperació posterior (Mackinnon et al., Ishida et al., 1993 a; Midha et al., 1993 a, b; Büttemeyer et al., 1995; Okajima et al., 2002) i en d'altres amb una pèrdua permanent (Zalewski and Gulati, 1981, 1984; Yu et al., 1989; Anselin et al., 1992). En el nostre estudi (Treball 5) es pot veure una marcada pèrdua funcional després de la interrupció del tractament, que al final del seguiment (gairebé dos mesos després) no s'ha recuperat. En un seguiment més llarg (Addenda al Treball 5) només la funció nociceptiva i sensorial aconsegueix igualar-se amb la dels al·loempelts no tractats al cap de nou mesos, mentre que la funció motora mostra un grau de recuperació inferior. En qualsevol cas, els animals no aconsegueixen recuperar els bons nivells funcionals assolits mentre van estar immunosuprimits.

Efectivitat de l'FK506 sobre els diferents tipus de reparacions de reseccions severes

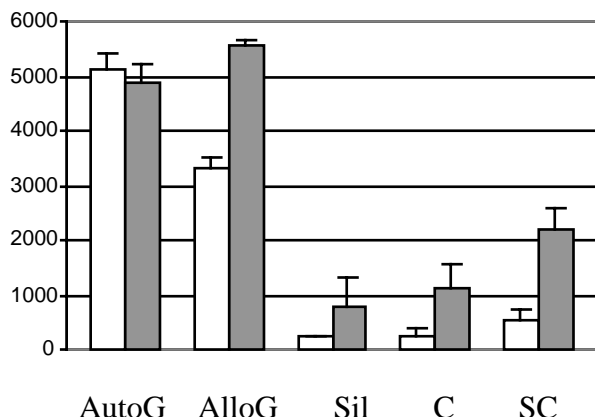
La reparació mitjançant empelts permet assolir uns nivells de recuperació funcional clarament superiors al que s'abasta mitjançant tubulització, ja sigui amb tubs de silicona, de col.lagen o amb guies plenes de cèl.lules de Schwann. No obstant, els animals amb al.loempelts que no reben immunosupressió mostren valors significativament inferiors als obtinguts mitjançant els altres tipus d'empelts, si bé significativament millors que els obtinguts amb tubulització en la majoria de grups, encara que no hi ha diferències estadístiques amb el grup reparat amb una guia de col.lagen plena de cèl.lules de Schwann i tractat amb FK506.

L'ús d'una guia amb cèl.lules de Schwann combinada amb tractament sistèmic amb FK506 permet assolir un índex de recuperació funcional significativament superior als altres tipus de guies neurals, si bé la reparació amb un tub de col.lagen combinada amb tractament també dóna molt bons resultats i no s'observen diferències estadístiques entre aquests dos grups en el nivell de recuperació funcional final.

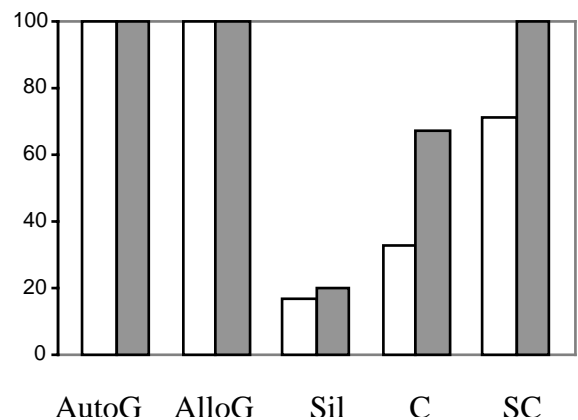
Quan es mira la capacitat dels diferents mètodes reparatius de garantir l'èxit en la reinnervació, es pot veure de nou que els empelts permeten la regeneració en tots els animals, mentre que el percentatge d'èxit en els grups on s'ha utilitzat la tubulització és molt inferior. No obstant, l'FK506 incrementa el percentatge d'èxit de manera marcada en els tubs de col.lagen i, de manera espectacular, en les guies plenes de SC, ja que en el segon cas el tractament condiona que tots els animals aconseguixin reinnervar.

A l'analitzar cada tipus de mètode reparatiu per separat es pot veure com l'administració d'FK506 permet incrementar notablement els nivells de recuperació en els al.loempelts (Treball 5) i en els tubs de col.lagen, portin o no cèl.lules transplantades al seu interior (Treball 6). Per contra, les diferències entre animals tractats i no tractats són limitades quan s'utilitzen autoempelts o tubs de silicona. En aquests dos casos ens trobem davant de situacions antagòniques: per una banda, els autoempelts, el millor mètode reparatiu per reseccions àmplies, amb una molt bona recuperació final. Per l'altra, el tub de silicona, amb resultats francament pobres en aquest tipus de lesions. Per contra, quan s'utilitzen tubs de col.lagen, situació que afavoreix la regeneració però amb limitacions, els efectes de l'FK506 són molt més notables. Finalment, tant en el cas dels al.loempelts com de les cèl.lules al.logèniques transplantades, cal tenir en compte que part de la millora obtinguda amb l'FK506 és deguda al seu efecte immunosupressor.

ÍNDEX DE RECUPERACIÓ FUNCIONAL



% ÈXIT REINNERVACIÓ



Nivells assolits en l'índex de recuperació funcional global (esquerra) i èxit de la reinnervació (dreta) 4 mesos després de la resecció de 6 mm del nervi ciàtic reparada mitjançant un autoempelt (AutoG), un al.loempelt (AlloG), un tub de silicona (Sil), una guia de col.lagen (C) o una guia de col.lagen amb cèl.lules de Schwann (SC), en animals control (en blanc) o animals tractats diàriament amb 5 mg/kg d'FK506 durant tot el seguiment (en gris)

Probable mecanisme d'acció de l'FK506 sobre la regeneració nerviosa

El mecanisme d'acció mitjançant el qual l'FK506 exerceix la neuroprotecció i promou la regeneració encara no està clar i molts estudis es mostren contradictoris en les conclusions. No obstant, cal tenir en compte que aquest medicament no actua mitjançant el clàssic mecanisme lligand-receptor, sinó que és determinant la geometria del complex que forma quan s'uneix a una immunofilina en concret (Schreiber, 1991). Això explica que un fàrmac d'estructura semblant a l'FK506, com la rapamicina, actui mitjançant un mecanisme d'acció diferent tot i unir-se a la mateixa immunofilina. També és aquesta la causa que tant l'FK506 com la CsA puguin compartir mecanismes d'acció, si bé són estructuralment diferents i s'uneixen a immunofilines diferents.

Per altra banda, la variabilitat i ubiqüitat de les immunofilines permet que aquests fàrmacs puguin desencadenar múltiples accions i a nivells molt dispars. Probablement, l'FK506 exerceix la seva acció pro-regenerativa mitjançant diversos mecanismes i, segurament, activant més d'una immunofilina. El fet que presenti una corba dosi-resposta amb un doble pic i que promogui tant la regeneració axonal com la ramificació col·lateral s'axons sans, dos mecanismes amb dependència neurotròfica diferent, suggereix que ha d'haver més d'un mecanisme implicat.

Com a alternativa a l'FKBP-12, immunofilina implicada en l'acció immunosupressora de l'FK506, l'equip de Gold proposa que la via responsable de l'acció neuroregeneradora és l'FKBP-52 (Gold et al., 1999; Gold 2000; Gold i Villafranca 2003; Gold et al., en premsa), una immunofilina associada al complex receptor esteroïdal. Aquest complex és l'encarregat del transport del receptor esteroide entre citoplasma i nucli a través d'un mecanisme depenent de microtúbuls. La unió de la dineïna, una proteïna motora, amb el complex, es faria a través de l'FKBP-52. De manera paral·lela, en les neurones, aquesta immunofilina podria intervenir en el transport axonal retrògrad. Ja que l'FK506 no actua alterant la funció de les immunofilines (per tant, no afectaria la capacitat de la FKBP52 d'unir-se a la dineïna), podria actuar estabilitzant l'FKBP-52 de la degradació, fet que facilitaria el transport de soluts en els axons (Pratt et al., 2000). L'FK506, a l'unir-se a la FKBP-52 i dissociar el complex, propicia també l'alliberació de la chaperona p23 i la hsp 90, (revisió de Pratt i Toft, 1997) que activen la cascada raf-MEK-MAPK (Gold i Zhong, en premsa; Setalo et al., 2002), cascada implicada en els efectes neurotròfics de molts factors neurotròfics (revisió de Kaplan, 2002) (per més detalls, veure *Immunofilines en el sistema nerviós*, Introducció). Tant l'activació de l'ERK (un membre de la família de les MAPK) com la p23 són claus en la capacitat de l'FK506 de promoure l'elongació de les neurites (Gold i Zhong, en premsa). No obstant, encara no es coneixen els darrers efectors de la cascada de senyals que desencadena l'FK506. En darrer terme, un increment de GAP-43, podria explicar els efectes neurotròfics de l'FK506. Aquesta proteïna, que juga un paper important en la regeneració axonal (Benowitz i Routtenberg, 1997) veu incrementats els seus nivells d'expressió després d'una lesió nerviosa i del tractament amb FK506 (Gold et al., 1998, Madsen et al., 1998).

Però una major expressió de GAP-43 en neurones no acabaria d'explicar el notable increment d'èxit en la regeneració a través de tubs de col·lagen en els animals tractats amb FK506. De manera que no pot descartar-se que, en paral·lel a la seva acció sobre les neurones i la seva capacitat per potenciar l'elongació axonal, l'FK506 també afecti les cèl·lules de Schwann, si bé hi ha molt pocs indicis sobre el paper de les immunofilines en les cèl·lules glials. La GAP-43 també s'expressa en les cèl·lules de Schwann precoçment després d'una lesió (Curtis et al., 1992) i podria estar relacionada amb la motilitat i l'elongació d'aquestes cèl·lules durant la regeneració (Hall et al 1992; Ide, 1996). L'FK506 també podria facilitar la migració de les cèl·lules glials mitjançant la seva interacció amb la cascada de senyalització de l'NGF (Gold et al., 1999a, Gold 2000, Gold i Villafranca 2003), ja que aquesta neurotrofina, secretada per les cèl·lules de Schwann denervades (Heumann et al., 1987b)

modulada la migració d'aquestes (Anton et al., 1994). Finalment, la capacitat de l'FK506, en cultius primaris de cèl.lules de Schwann, de potenciar la raó cèl.lules glials/fibroblasts (Fansa et al., 2000) pot afavorir la formació d'un ambient adient per la regeneració a través de les guies neurals. La inhibició de la proliferació de fibroblasts a través de la matriu inicial de fibrina que uneix els dos extrems nerviosos dins de la llum de la guia facilitaria la migració de les cèl.lules de Schwann al seu interior i, per tant, afavoriria la posterior regeneració. (Dubovy, 1998).

Per altra banda, no es pot descartar que, en paral·lel a la seva acció neuroprotectora, l'FK506 exerceixi el seu efecte neurotròfic mitjançant síntesi de novo, potser també induint una resposta de les *heat shock proteins* (Klettner i Herdegen, 2003). Així, l'FK506 podria estabilitzar la FKBP-52 però també incrementar-ne la seva síntesi i, a llarg terme, potenciar el seu propi efecte.

CONCLUSIONS

1. L'administració d'FK506 accelera la taxa de regeneració axonal després de lesions per aixafament. La corba dosi resposta mostra dos pics de màxim efecte, a 0.2 i 5mg/kg/dia, si bé la dosi de 5 mg/kg permet assolir millors nivells de recuperació funcional.

2. L'FK506 incrementa la reinnervació dels òrgans diana mitjançant la regeneració axonal i la ramificació col·lateral, dos processos amb una regulació neurotròfica diferent.

3. No hi ha una relació directa entre l'efecte immunosupressor i l'efecte neuroregeneratiu de l'FK506, ja que la dosi de 0.2 mg/kg/dia, si bé té un efecte promotor en la taxa de regeneració, no es mostra eficaç com a immunosupressora i només amb la dosi de 5mg/kg/dia s'evita el rebuig de transplants d'origen al·logènic o xenòleg.

4. Quan s'analitzen els efectes de l'administració d'FK506 en lesions més severes (reseccions), el mètode de reparació quirúrgic utilitzat és determinant en els resultats.

4.1. En les reseccions reparades mitjançant autoempelts, on la regeneració és bona per se, l'FK506 només accelera lleugerament el dia d'inici i el grau màxim de recuperació assolit al final del seguiment.

4.2. En les reseccions reparades mitjançant empelts d'origen al·logènic, l'administració contínua d'FK506 a una dosi immunosupressora permet evitar el rebuig i igualar l'eficàcia d'aquest mètode reparatiu amb els empelts d'origen autòleg.

4.3. En les reseccions reparades mitjançant guies de silicona, on la regeneració és molt limitada, l'administració d'FK506 no permet incrementar el pobre percentatge d'èxit en la reinnervació.

4.4. En les reseccions reparades mitjançant guies de col.lagen, un model intermig, els efectes de l'administració d'FK506 són destacables, ja que es promou tant el percentatge d'èxit en la regeneració com el dia d'inici i la recuperació funcional final.

4.5. Si s'introdueixen cèl.lules de Schwann al·logèniques al seu interior, un model de guia neural que intentat mimetitzar l'empelt nerviós, l'administració d'FK506 garanteix l'èxit de la reinnervació, si bé no aconsegueix que els resultats funcionals assolits s'igualin amb els que s'aconsegueixen amb l'ús d'empelts.

5. L'administració contínua d'FK506 no es mostra més eficaç que l'administració discontinua en promoure la regeneració en lesions nervioses severes que no demanen tractament immunosupressor. No obstant, en el cas dels al·loempelts, la interrupció del tractament suposa una pèrdua de la funció assolida. Hi ha una recuperació tardana però, a llarg termini, no aconsegueix ni tant sols igualar els nivells assolits pels animals amb al·loempelts que no havien estat mai immunosuprimits.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 483-510.
- Aguayo AJ, Bray GM, Perkis CS, Duncan ID. Axon-sheath cell interactions in peripheral and central nervous system transplants. *Soc Neurosci Symp* 1979, 4: 361-383.
- Aigner L I Caroni R. Absence of persistent spreading, branching and adhesion in Gap-43-depleted growth cones. *J Cell Biol* 1995, 128: 647-660.
- Anderson PN, Mitchell J, Mayor J, Staubey VV. An ultrastructural study of the early stages of axonal regeneration through rat nerve graft. *Neuropath Appl Neurobiol* 1983, 9: 455-466.
- Angelov DN, Neiss WF, Streppel M, Andermahr J, Mader K, Stennert E. Nimodipine accelerates axonal sprouting after surgical repair of rat facial nerve. *J Neurosci* 1996, 16: 1041-1048.
- Anselin AD, Fink T, Davey DF. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997, 23: 387-398.
- Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD. Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 2795-99.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Falk RE, Falk JA, Hunter DA. The peripheral nerve allograft. An assessment of regeneration across nerve allografts in rats immunosuppressed with cyclosporin A. *Plast Reconstr Surg* 1988, 82:1052-1066.
- Bain JR, Mackinnon SE, Hudson AR, Wade J, Evans P, Makino A, Hunter D. The peripheral nerve allograft in the primate immunosuppressed with Cyclosporin A: I. Histologic and electrophysiologic assessment *Plast Reconstr Surg* 1992, 90: 1036-46.
- Begley DJ, Squires LK, Zlokovic BV, Mitrovic DM, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J. Permeability of the blood-brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin A. *J Neurochem* 1990, 55: 1222-1230.
- Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 1997, 20: 84-91.
- Bierer BE, Somers PK, Wandless TJ, Burakoff SJ, Schreiber SL. Probing immunosuppression action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* 90, 250: 556-559.
- Brockes JP. Assays for cholinergic properties in cultured rat Schwann cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1984 Jul 23, 222: 121-34.
- Brown EJ, Beal Pa, Keith Ct, Chen J, Bum Shin, Schreiber SL. Control of p70 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* 1995, 377: 441-446.
- Brown MC, Holland RL, Hopkins WG. Motor nerve sprouting. *Annu Rev Neurosci* 1981, 4: 17-42.
- Brushart TM, Tarlov EC, Mesulam MM. Specificity of muscle reinnervation after epineurial and individual fascicular suture of the rat sciatic nerve. *J Hand Surge* 1983, 8: 248-253.

- Butcher SP, Henshall DC, Teramura Y, Iwasaki K, Sharkey J. Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an excitotoxic mechanism. *J Neurosci* 1997, 17: 6939-6946.
- Butí M, Verdú E, Labrador RO, Vilches JJ, Forés J, Navarro X. Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Exp Neurol* 1996, 137: 26-33.
- Büttemeyer R, Rao U, Jones NF. Peripheral nerve allograft transplantation with FK506: functional, histological and immunological results before and after discontinuation of immunosuppression. *Ann Plast Surg* 1995, 35:396-401.
- Cabaud HE, Rodkey WG, McCarroll HR. Peripheral nerve injuries: studies in higher nonhuman primates. *J Hand Surg* 1980, 5: 201-206.
- Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM Ronnett, Snyder SH. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5 trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca⁺⁺ flux. *Cell* 1995b; 83: 463-472.
- Cameron AM, Steiner JP, Sabatini DM, Kaplin AI, Walensky LD, Snyder SH: Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 145-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995a; 92: 1784-1788.
- Cannon A. Law of denervation. *Am J Med Sci* 1939, 198: 739-750.
- Carlsson J, Lais AC, Dyck PJ. Axonal atrophy from permanent peripheral axotomy in adult cat. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1979, 38: 579-588.
- Chamberlain, L.J., Yannas, I.V., Hsu, H-P., Stritchartz, G. and Spector, M. Collagen-GAG substrate enhances the quality of nerve regeneration through collagen tubes up to level of autograft. *Exp Neurol* 1998, 154: 315-329.
- Chang HY, Takey K, Sydor AM, Born AM, Rusnak F, Jay DG. Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 1995, 376: 689-690.
- Chiu AY, Espinosa de los Monteros A, Cole RA, Loera S, de Vellis J. Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, Schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia* 1991, 4: 11-24.
- Cohen JA, Yachnis AT, Arai M, Davis JG, Scherer SS. Expression of the neu proto-oncogene by Schwann cells during peripheral nerve development and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 1992, 31: 622-634.
- Constantini LC, Isacson O. Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture. *Exp Neurol* 2000; 164: 60-70.
- Crabtree GR. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 1989, 243: 355-361.

- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999, 341: 233-249.
- Curtis R, Stewart HJS, Hall SM, Wilkin GP, Mirsky R, Jessen KR. GAP-43 is expressed by nonmyelinated-forming Schwann cells of the peripheral nervous system. *J Cell Biol* 1992, 116:1455-1464.
- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 9808-9812.
- Dawson TM. Immunosuppressants, immunophilins and the nervous system. *Ann Neurol* 1996; 40: 559-560.
- Devor M, Schonfeld D, Seltzer Z, Wall PD. Two modes of cutaneous reinnervation following peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 1979, 185: 211-220.
- Diamond J, Foerster A. Recovery of sensory function in skin deprived of its innervation by lesion of the peripheral nerve. *Ex. Neurol* 1992, 115: 100-103.
- Diamond J, Holmes M, Coughlin M.. Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat. *J Neurosci* 1992, 12: 1454-1466.
- Doolabh VB, Mackinnon SE. FK506 accelerates functional recovery following nerve grafting in a rat model. *Plastic Reconstr. Surg* 1999, 103: 1928-1936.
- Doucette R, Diamond J. Normal and precocious sprouting of heat nociceptors in the skin of adult rats. *J Comp Neurol* 1987, 261: 592-603.
- Dubernard JM, Owens E, Herxberg G, Lanzetta M, Martin X, Kaila H, Dawahra M, Hakim NS. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet* 1999, 353: 1315-1320.
- Dubovy P i Aldskogios H. Growth-associated protein (GAP-43) in terminal Schwann cells of rat Pacinian corpuscles. *NeuroReport* 1996, 7: 2147-2150.
- Dubovy P, Svizenska I. Denervated skeletal muscle stimulates migration of Schwann cells from the distal stump of transected peripheral nerve: an in vivo study. *Glia* 1994, 12: 99-107.
- Dubovy P. Schwann cells- Development and regeneration of the nervous system. *Acta Facultatis Medicae, Masaryk University Brno*, 1998.
- Ducker B, Post traumatic peripheral nerve regeneration: experimental basis and clinical implications. Raven Press, New York 1981, p47.
- Fansa H, Keilhoff G, Altmann S, K Plogmeier, Wolf G, W. Schneider. The effect of the immunosuppressant FK506 on peripheral nerve regeneration following nerve grafting. *J Hand Surg* 1999, 24: 38-42.
- Fansa H, Keilhoff G, Horn T, Altmann S, Wolf g, Schneider W. Stimulation of Schwann cell proliferation and axonal regeneration by FK506. *Restor Neurol Neurosci* 2000, 16: 77-86.
- Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990, 13: 43-60.

- Feng FY, Ogden MA, Myckatyn TM, Grand AG, Jensen JN, Hunter DA, Mackinnon SE. FK506 rescues peripheral nerve allografts in acute rejection. *J Neurotrauma* 2001, 18:217-229.
- Figueras A, Morales-Olivas FJ, Capella D, Palop V, Laporte JR. Bovine gangliosides and acute motor polyneuropathy. *BMJ* 1992, 305:1330-1.
- Flanagan WM, Corthest B, Brom RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK506 and cyclosporin A. *Nature* 1991, 352:754-755.
- Friberg H, Ferrand-Drake M, Bengtsson F, Halestrap AP, Wieloch T. Cyclosporin A, but not FK506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci* 1998; 18: 5151-5159.
- Friede RL i Bischhause R. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections. *J Neurol Sci* 1980, 44: 181-203.
- Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosupresion. *FASEB J* 1994, 8: 391-400.
- Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997, 14:67-116.
- Gispén WH, Nielander HB, De Graan PN, Oestreicher AB, Schrama LH, Schotman P. Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol*. 1991, 5: 61-85.
- Gloster A, Diamond J. Sympathetic nerves in adult rats regenerate normally and restore pilomotor function during an anti-NGF treatment that prevents their collateral sprouting. *J Comp Neurol* 1992, 326: 363-374.
- Gloster A, Diamond J. Sympathetic nerves in adult rats regenerate normally and restore pilomotorfunciton during and anti-NGF treatment that prevents their collateral sprouting. *J Comp Neurol* 1992, 326:363-374.
- Gold BG i Villafranca JE. Neuroimmunophilin ligands: The development of novel neuroregenerative/neuroprotective compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3:1368-1375, 2003.
- Gold BG i Zhong Y-P. FK506 requires stimulation of the extracellular signal regulated kinase 1/2 and the steroid receptor chaperone protein p23 for neurite elongation. *NeuroSignals*, en premsa.
- Gold BG, DensmoreV, Shou W, Matzuk MM, Gordon HS. Immunofilin FKBP52 (not FKBP12) mediates de neuroprotective action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 289: 1202-1210.
- Gold BG, Gordon HS, Wang MS. Efficacy of delayed or discontinuous FK506 administration on nreve regeneration in the rat sciatic nerve crush model: lack of evidence for a conditioning lesion-like effect. *Neurosci Lett* 1999, 267: 33-36.
- Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T. The immunosupressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1995, 15: 7509-7516.

- Gold BG, Storm-Dikerson, Austin DR. The immunosuppressant FK506 increases functional recovery and nerve regeneration following peripheral nerve injury. *Restor Neurol Neurosci* 1994, 6:287-296.
- Gold BG, Udina E, Bourdette D and Navarro X. Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies. *Neurological Research*, en premsa.
- Gold BG, Yew JY, Zeleny-Pooley M. The immunosuppressant FK506 increases GAP-43 mRNA levels in axotomized sensory neurons. *Neurosci Lett* 1998, 241: 25-28.
- Gold BG, Zeleny-Pooley M, Wang MS, Chaturvedi P, Armistead DM. A nonimmunosuppressant FKBP-12 ligand increases nerve regeneration. *Exp Neurol* 1997, 147:269-278.
- Gold BG. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997, 15:285-306.
- Gold BG. Neuroimmunophilin ligands and the role of Steroid Receptor Chaperone Proteins in nerve regeneration. 2000, 10:2331-2342. In: Gold BG, Fishcer G, Herdegen T (Eds.). *Immunophilins in the brain. FKBP ligands: Novel strategies for the treatment of neurodegenerative disorders*. Porus Science. Barcelona 2000.
- Gómez N, Cuadras J, Butí M, Navarro X. Histological assessment of sciatic nerve regeneration following resections and graft or tube repair in the mouse. *Restor Neurol Neurosci* 1996, 10: 187-196.
- Grabb WC. Median and ulnar nerve suture. An experimental study comparing primary and secondary repairs in monkeys. *Journal of Bone and Joins Surgery*, 1986. 50: 964-972.
- Greenberg Me, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neural acetylcholinia receptors induces rapid gene transcription. *Science* 1986, 234: 80-83.
- Guénard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 1992, 12: 3310-3320.
- Guo X, Dillman JF, Dawson VL, Dawson TM. Neuroimmunophilins. Novel neuroprotective and neuroregenerative targets. *Ann Neurol* 2001, 50:6-16.
- Gutmann E, i Sanders FK. Recovery of fiber numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerve. *J Physiol* 1943, 101:489-518.
- Hall SM. The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the re-innervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986b, 12: 401-414.
- Hall SM, Kent AP, Curtis R, Robertson D. Electron microscopic immunocytochemistry of GAP-43 within proximal and chronically denervated distal stumps of transected peripheral nerve. *J Neurocytol* 1992, 21: 820-831.

- Hall SM. Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1986a, 76: 83-89.
- Hamilton GS, Steiner JP. Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem* 1998; 41: 5120-5143.
- Heumann R, Korsching S, Bandtlow G, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, Thoenen H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration. Role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987b, 84: 8735-8739.
- Heumann R, Korsching S, Bandtlow G, Thoenen H. Changes in nerve growth factors synthesis in non-neural cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 1987, 104: 1623-31.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res.* 1996, 25: 101-21.
- Ishida O, Daves J, Tsai T, Breidenbach WC, Firrell J. Regeneration following rejection of peripheral nerve allografts of rats on withdrawal of cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 1993, 92:915-926.
- Ishida O, Martin A, Firrell JC. Origin of Schwann cells in peripheral nerve allografts in the rat after withdrawal of cyclosporine. *J Reconstr Microsurg* 1993, 9:234-236.
- Ishida O, Ochi M, Miyamoto Y, Ikuta Y, Akiyama M. Suppression by cyclosporine of cellular and humoral reactivity after peripheral nerve allografts in mice. *Transplantation* 1989,48: 824-829.
- Jackson PC, Diamond J. Temporal and spatial constraints on the collateral sprouting of low-threshold mechanosensory nerves in the skin of rats. *J Comp Neurol* 1984, 226:336-345.
- Jenq CB, Coggeshall RE. Permeable tubes increase the length of the gap that regenerating axons can span. *Brain Res* 1987, 408: 239-242.
- Jenq CB, Coggeshall RE. The effects of an autologous transplant on patterns of regeneration in rat sciatic nerve. *Brain Res* 1986, 364: 45-56.
- Johnson EM Jr, Taniuchi M, DiStefano PS. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci* 1988, 11: 299-304.
- Jones JW, Gruber SA, Barker, JH and Breidenbach WC. Successful hand transplantation. One-year follow-up. *N Engl J Med* 2000, 343: 468-473.
- Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000, 10:381-391.
- Kaupilla T, Jyvasjarvi E, Huopaniemi T, Hujanen E, Liesi P. A laminin graft replaces neurotaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 1993, 123: 181-191.
- Keeley R, Atagi T, Sabelman E, Padilla J, Kadlicik P, Agras J, Eng L, Wiedman T, Nguyen K, Sudekum A, Rosen J. Synthetic nerve graft containing collagen and synthetic Schwann cells improves functional, electrophysiological, and histological parameters of peripheral nerve regeneration. *Restor Neurol Neurosci* 1993, 5: 353-366.
- Kelly RB, Grote E. Protein targeting in the neuron. *Annu Rev Neurosci* 1993, 16: 95-127.

- Kennedy WR, Navarro , Kamei H. Reinnervation of sweat glands in the mouse: axonal regeneration versus collateral sprouting. *Muscle Nerve* 1988, 11: 603-609.
- Kim DH, Connolly SE, Kline DG, Voories RM, Smith A, Powell M, Yoes T, Daniloff JK. Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair. *J Neurosurg* 1994, 80: 254-260.
- Klettner A, Baumgrass R, Zhang Y, Fischer G, Burger E, Herdegen T, Mielke K. The neuroprotective actions of FK506 binding protein ligands: neuronal survival is triggered by the novo RNA synthesis, but is independent of inhibition of JNK and calcineurin. *Brain Res Mol Brain Res* 2001, 97: 21-31.
- Klettner A, Herdegen T. The immunophilin-ligands FK506 and V-10,367 mediate neuroprotection by the heat shock response. *British J Pharmac* 2003, 128: 1004-1012.
- Kline DG, Hudson AR, Bratton BR. Experimental study of fascicular nerve repair with and without epineurial closure. *J Neurosurg* 1981, 54: 513-520.
- Kuffler DP. Accurate reinnervation of motor end plates after disruption of sheath cells and muscle fibers. *J Comp Neurol* 1986, 250:228-235.
- Labrador RO, Butí M, Navarro X. Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp Neurol* 1998, 149: 243-252.
- Labrador RO, Butí M, Navarro X. Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery. *Neuroreport* 1995, 6: 2022-2026.
- Landis SC. Neuronal growth cones. *Ann Rev Physiol* 1983, 45: 567-580.
- Lassner F, Schaller E, Strinhoff G, Wonigrit K, Walter GF, Berger A. Cellular mechanisms of rejection and regeneration in peripheral nerve allografts. *Transplantation* 1989, 48:386-392.
- Le Beau JM, Schwann Cell-axon interaction during rat peripheral nerve regeneration and remyelination. Thesis, University of California San Diego (Referència de Lundborg, 1988).
- Lee M, Doolabh VB, Mackinnon SE, Jost S. FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve* 2000, 23: 633-640.
- Letourneau PC. The Cytoskeleton in nerve growth cone motility and axonal pathfinding. *Presp Develop Neurobio* 1996, 4: 111-123.
- Levi AD, Bunge RP. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. *Exp Neurol* 1994, 130: 41-52.
- Levi ADO, Sonntag VKH, Dickman C, Mather J, Li R, Cordoba SC, Bichard B, Berens M. The role of cultured Schwann cell grafts in the repair of gaps within the peripheral nervous system of primates. *Exp Neurol* 1997, 143: 25-36.
- Liu J, Farmer JD, Lane SW, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66: 807-815.

- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol* 1982, 76: 361-375.
- Lundborg G, Roawn B, Dahlin L, Danielsen N, Holmberg J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study. *J Hand Surg* 1997, 22: 99-106.
- Lundborg G. Nerve injury and repair. Churchill Livingstone, London, 1988.
- Lunn ER, Brown MC, Perry VH. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience* 1990, 35: 157-165.
- Lyons WE, George EB, Dawson TM, Steiner JP, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 3191-3195.
- Lyons WE, Steiner JP, Snyder HS, Dawson TM. Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP12. *J Neurosci* 1995, 15: 2985-2994.
- Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien J. Changes in nerve fibre numbers distal to nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve* 1991, 14: 1116-1122.
- Mackinnon SE, Hudson AR, Bain JR, Falk RE, Hunter DA. The peripheral nerve allograft: An assessment of regeneration in the immunosuppressed host. *Plast Reconstr Surg* 1987, 79:436-446.
- Mackinnon SE, Midha R, Bain J, Hunter D, Wade J. An assessment of regeneration across peripheral nerve allografts in rats receiving short courses of cyclosporin A immunosuppression. *Neuroscience* 1992, 46:583-593.
- Madison RD, Da Silva CF, Dikkes P. Entubation repair with protein additives increases the maximum nerve gap distance successfully bridged with tubular prostheses. *Brain Res* 1988, 447: 325-334.
- Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Meiri KF, Rimm IJ, Steig PE, Benowitz LI. Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 1998; 154: 673-683.
- Manthorpe M, Engvall E, Ruoslathi E, Longo FM, Davis GE, Varon S. Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J Cell Biol* 1983, 97: 1882-1890.
- Margreiter R, Brandacher G, Ninkovic M, Steurer W, Kreczy A, Schneeberger S. A double-hand transplant can be worth the effort! *Transplantation* 2002, 74:85-90.
- Marks AR. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev* 1996, 76:631-649.
- Martini R i Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-Camp, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 1988, 106: 1735-1746.
- Mattson MP and Kater SB. Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J Neurosci* 1987, 7: 4034-4043.

- Meiri KF, Bickerstaff LE, Schwob JE. Monoclonal antibodies show that kinase C phosphorylation of GAP-43 during axonogenesis is both spatially and temporally restricted in vivo. *J Cell Biol* 1991, 112: 991-1005.
- Midha R, Mackinnon SE, Evans PJ, Best TJ, Hare GMT, Hunter DA, Falk-Wade JA. Comparison of regeneration across nerve allografts with temporary or continuous cyclosporin A immunosuppression. *J Neurosurg* 1993a, 78:90-100.
- Midha R, Evans PJ, Mackinnon SE, Wade JA. Temporary immunosuppression for peripheral nerve allografts. *Transplant Proc* 1993b. 25:532-536.
- Midha R, Mackinnon SE, Becker LE. The fate of Schwann cells in peripheral nerve allografts. *J Neurophatol Exp Neurol* 1994, 53:316-322.
- Montserrat L, Benito M. Facial Synkinesis and aberrant regeneration of facial nerve. *Adv Neurol* 1988, 49: 211-224.
- Morgan i Curran. Role in ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 1986, 7-13: 552-555.
- Nadim W, Anderson PN, Turmaine M. The role of Schwann cells and basal lamina tubes in the regeneration of axons through long lengths of freeze-killed nerve grafts. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990, 16: 411-421.
- Navarro X, Kennedy WR. Effect of age on collateral reinnervation of sweat glands in the mouse. *Brain Res* 1988, 463: 174-181.
- Navarro X, Rodríguez FJ, Labrador RO, Butí M, Ceballos D, Gómez N, Cuadras J, Perego G. Peripheral nerve regeneration through bioresorbable and durable nerve guides. *J Periph Nerv System* 1996, 1: 53-64.
- Navarro X, Udina E, Ceballos D, Gold BG. Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. *Muscle Nerve* 2001, 24: 905-915.
- Navarro X, Verdú E, Butí M. Comparison of the regenerating and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol* 1994, 129: 217-224.
- Navarro X., Verdú E, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR. Immunohistochemical study of reinnervation by regenerative axons. *J Comp Neurol* 1997, 380: 164-174.
- Nixon BJ, Doucette R, Jackson PC, Diamond J. Impulse activity evokes precocious sprouting of nociceptive nerves into denervated skin. *Somatosens Res* 1984, 2: 97-126.
- Okajima S, Hojo T, Tamai K, Takai S, Hirasawa Y. Histological and electrophysiological analysis of the peripheral nerve allografts using an immunosuppressive agent. *Microsc Res Tech* 2002, 58:52-58.
- Omer GE, Spinner M, Van Beek AL (eds.) *Management of peripheral nerve problems*. 2 nd edition, WB Saunders Company 1998, Philadelphia.
- Pellegrino RG i Spencer PS, Schwann cell mitosis in response to axonal degeneration. *Brain Res* 1985, 341: 16-25.

- Pellegrino RG, Politis MJ, Ritchie JM, Spencer PS. Events in degenerating cat peripheral nerve: induction of Schwann cell S phase and its relation to nerve fibre degeneration. *J Neurocytol* 1986, 15: 17-28.
- Perry VH, Brown MC, Gordon S. The macrophage response to central and peripheral nerve injury: a possible role for macrophages in regeneration. *J Exp Med* 1987, 165: 1218-1233.
- Pollard JD, Fitzpatrick L. A comparison of the effects of irradiation and immunosuppressive agents on regeneration through peripheral nerve allografts: an ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 1973, 23:166-180.
- Pollard JD, McLeod JG, Gye RS. Regeneration through peripheral nerve allografts. *Arch Neurol* 1973, 28:31-37.
- Pratt WB and Toft DO. Steroid receptor interactions with Heat Shock Protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Rev* 1997, 18: 306-360.
- Pratt WB, Silverstein AM, Galigniana MD. A model for the cytoplasmic trafficking of signaling proteins involving the Hsp90-binding immunophilin FKBP52. In: Gold BG, Fishcer G, Herdegen T (Eds.). *Immunophilins in the brain. FKBP ligands: Novel strategies for the treatment of neurodegenerative disorders*. Porus Science. Barcelona 2000, 37-47.
- Rodríguez FJ, Gómez N, Labrador RO, Butí M, Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Improvement of regeneration with predegenerated nerve transplants in silicone chambers. *Restor Neurol Neurosci* 1999, 14: 65-79.
- Rodríguez FJ, Verdú E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 2000, 161: 571-584.
- Scaravill F. Regeneration of the perineurium across a surgically induced gap in nerve encased in a plastic tube. *J Anat* 1984, 139:411-424.
- Sctalo G Jr, Singh M, Guan X, Toran-Allerand CD. Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex. The role of heat shock protein 90 (hsp90) and MEK2. *J Neurobiol* 200, 50: 1-12.
- Scheff SW, Sullivan PG. Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents. *J Neurotrauma* 1999, 16:783-792.
- Schonhofer PS. Guillain-Barré syndrome and parenteral gangliosides. *Lancet* 1991, 338: 757.
- Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991, 251:283-287
- Schreiber SL i Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992, 13:136-142.
- Seddon HJ. Three types of nerve injury. *Brain* 1943, 66: 237-288.
- Sheng M i Greenberg Me. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990, 4:477-85

- Skene JHP. Axonal growth-associated proteins *Annu Rev Neurosci* 1989, 12:127-156.
- Snyder S, Sabatini D. Immunophilins and the nervous system. *Nature Med* 1995, 1:32-37.
- Snyder SH, Lai MM, Burnett PE. Immunophilins in the nervous system. *Neuron* 1998, 21: 283-294.
- Son Y-J, Trachtenberg T, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *TINS* 1996, 19:280-285.
- Stankovic N, Johansson O, Hildebrand C. Occurrence of epidermal nerve endings in glabrous and hairy skin of the rat foot after sciatic nerve regeneration. *Cell Tissue Res* 1996, 284: 161-166.
- Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL et al. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nature Med* 1997a, 3:421-428.
- Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Eglatt C, Snowman AM, Cohen N, Snyder SH. High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature* 1992, 358:584-587.
- Steiner JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Connolly MA, Liang S, Ramsey C, Li JH, Huang W, Howorth P, Soni R, Fuller M, Sauer H, Nowotnik AC, Suzdak PD. Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997b, 94:2019-24.
- Stoll C, Griffin W, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 1989, 18: 671-683.
- Stoll G I Muller HW. Macrophages in the peripheral nervous system and astroglia in the central nervous system of rat commonly express apolipoprotein E during development but differ in their response to injury. *Neurosci Lett* 1986, 72. 233-238.
- Strasberg SR, Mackinnon SE, Genden EM, Bain JR, Purcell CM, Hunter DA, Hay JB. Long segment nerve allograft regeneration in the sheep model: experimental study and review of the literature. *J Reconstr Microsurg* 1996, 12:529-537.
- Strittmatter SM, Igarashi M, Fishman MC. GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *J Neurosci* 1994, 14: 5503-5513.
- Südhof TC i Jahn R. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 1991, 6: 665-677.1991
- Sulaiman OAR, Voda J, Gold BG, Gordon T. FK506 increases peripheral nerve regeneration after chronic axotomy but not after chronic Schwann cell denervation. *Exp Neurol* 2002, 175:127-137.
- Sumner AJ. Aberrant reinnervation. *Muscle Nerve* 1990, 13: 801-803.
- Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 1951, 74: 491-516.

- Sunderland S. Factors influencing the course of regeneration and the quality of the recovery after nerve suture. A Sunderland S (ed). Nerve and nerve injuries. Churchill Livingstone 1978, pp. 596-592, Edimburgh.
- Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. Trends Neurosci 1991, 14: 165-170.
- Toft PB, Fugleholm K, Schmalbruch H. Axonal branching following crush lesions of peripheral nerves of rat. Muscle Nerve 1988, 11: 880-889.
- Uchino H, Elmér E, Uchino K, Lindvall O, Siesjö BK. Cyclosporin A dramatically ameliorates Ca²⁺ hippocampal damage following transient forebrain ischemia in the rat. Acta Physiol Scand 1995; 155: 469-471.
- Uchino H, Minamikawa-Tachino R, Kristian T, Perkins G, Narazaki M, Siesjö BK, Shibasaki F. Differential neuroprotection by cyclosporin A and FK506 following ischemia corresponds with differing abilities to inhibit calcineurin and the mitochondrial permeability transition. Neurobiol Dis 2002, 10: 219-33.
- Valero-Cabré A, Navarro X. Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. J Neurotrauma 2002, 19: 1475-85.
- Valero-Cabré A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. J Neurotrauma, en premsa.
- Van Lookeren Campagne M, Oestreicher AB, Van Bergen En Henegouwen PMP, Gispen WH. Ultrastructural immunocytochemical localization of B50/GAP-43, a protein kinase C substrate, in isolated presynaptic terminals and neuronal growth cones. J Neurocytol 1989, 18: 479-489.
- Verdú E and Navarro X. Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin muscle after peripheral nerve injury. Exp Neurol 1997, 146: 187-198.
- Verdú E I Navarro X. The role of Schwann cell in nerve regeneration. In Understanding Glial Cells B. Castellano, B. González, and M. Nieto-Sampedro, (Eds.) pp. 319-359. Kluwer Academic Pub, 1998, Boston.
- Verdú E, Navarro X. Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. Exp Neurol 1997, 146:187-198.
- Wang MS, Zeleny M, Gold BG. Comparative dose dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. J Pharmacol Exp Ther 1997, 282: 1084-1097.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptor of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12. Science 1994; 265: 674-676.
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta receptor family type I receptor. Cell 1996; 88: 435-444.
- White FV, Toews AD, Goodrum JF, Novicki DL, Bouldin TW, Morell P. Lipid metabolism during early stages of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. J Neurochem 1989, 52: 1085-1092.

BIBLIOGRAFIA

- Williams LR, Azzam NA, Zalewski AA, Azzam RN. Regenerating axons are not required to induce the formation of a Schwann cell cable in a silicone chamber. *Exp Neurol* 1993, 120:49-59.
- Williams LR, Longo FM, Powell HC, Lundborg G, Varon S. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber. Parameters for a bioassay. *J Comp Neurol* 1983; 218: 160-170.
- Williams LR. Exogenous fibrin matrix precursors stimulate the temporal progress of nerve regeneration within a silicone chamber. *Neurochem Res* 1987, 12: 851-860.
- Wood P i Bunge RP. Evidence that sensory axons are mitogenic for Schwann cells. *Nature* 1975, 256: 662-664.
- Woolf CJ, Reynolds ML, Chang MS, Emson P, Irwin N, Benowitz LI. Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. *J Neurosci* 1992, 12: 3999-4010.
- Yagita Y, Kitagawa K, Matsushita K, Taguchi A, Mabuchi T, Ohtsuki T, et al. Effect of immunosuppressant FK506 on ischemia-induced degeneration of hippocampal neurons in gebrils. *Life Sci* 1996, 59: 1643-1650.
- Yu LT, England J, Hickey WF, Sumner A, Rhee E, Rostami A, Larossa D. Survival and function of peripheral nerve allografts after cessation of long term cyclosporin immunosuppression in rats. *Transplant Proc* 1989, 21: 3178-3180.
- Yu LT, England J, Sumner A, Larossa D, Hickey WF. Electrophysiologic evaluation of peripheral nerve regeneration through allografts immunosuppressed with cyclosporin. *J Reconstr Microsurg* 1990, 6: 318-323.
- Zalewski AA, Azzam NA, Azzam RN. The loss of regenerated host axons in nerve allografts after stopping immunosuppression with cyclosporin A is related to immune effects on allogenic Schwann cells. *Exp Neurol* 1995, 133: 189-197.
- Zalewski AA, Gulati AK . Rejection of nerve allografts after cessation of immunosuppression with cyclosporin A. *Transplantation* 1981, 31:88-89.
- Zalewski AA, Gulati AK Survival of nerve allografts in sensitized rats treated with cyclosporin A. *J Neurosurg* 1984, 60:828-834.