

IL RECUPERO DEL TONO E DEL TROFISMO MUSCOLARE MEDIANTE INNESTO DI NERVO SUTURATO CON TECNICA TERMINO-LATERALE. STUDIO SPERIMENTALE

I. PAPALIA*, F. STAGNO D'ALCONTRES**

* 1^a Clinica Chirurgica, Università degli Studi di Messina, Messina

** Cattedra di Chirurgia Plastica, Università degli Studi di Cagliari

Muscle tone and trophism recovery by means of end to side neurorrhaphy. Experimental study.

SUMMARY. *Muscle trophism, as well as function and tone, is related to an adequate innervation. In this paper we describe a new surgical technique to recover the innervation of a muscle totally denervated for destruction of its nerve or the neural portion. We performed this technique in wistar rat, by means of nerve graft sutured between a health donor nerve and the studied muscle. We harvested very interesting results (evaluated with morphological and histological observations) that would encourage continuation in this research to improve the technical aspects of the method used and to evaluate its eventually clinical applications and contraindications. Riv Chir Mano 2001; 38: 14-22*

KEY WORDS

End-to-side neurorrhaphy, muscle trophism

RIASSUNTO

Il trofismo di un muscolo, come del resto la funzionalità ed il tono, sono legati alla esistenza di una adeguata innervazione. In questo lavoro descriviamo una nuova tecnica chirurgica che permette la reinnervazione di un muscolo, o anche una parte di esso, totalmente denervato per mancanza del nervo o per distruzione della sua parte neurale. Tale tecnica, realizzata nel ratto wistar, prevede l'impiego di un innesto di nervo interposto tra un altro nervo donante sano ed il muscolo studiato. I risultati, valutati morfologicamente ed istologicamente, sono stati estremamente incoraggianti e ci inducono a proseguire in queste ricerche per migliorare gli aspetti tecnici e comprendere l'utilità clinica ed i limiti della metodica.

PAROLE CHIAVE

Sutura termino laterali, trofismo muscolare

INTRODUZIONE

La ricerca di nuove tecniche per il trattamento chirurgico delle lesioni dei nervi periferici è da sempre stato un obiettivo di grande interesse.

Esistono delle condizioni in cui le tecniche chirurgiche di più comune utilizzo non riescono a for-

nire delle soluzioni soddisfacenti. Ciò succede per esempio quando vi sia una completa ed estesa perdita, traumatica o di altra natura, di qualsiasi connessione tra il nervo periferico ed il corrispondente muscolo.

Negli ultimi tempi si è rinnovato l'interesse per le anastomosi termino-laterali (end-to-side degli

Arrived: 13 novembre 2000

Accepted: 17 gennaio 2001

Correspondence: Igor Papalia, Via S. Agostino, 23 - 98122 Messina, Italia - e-mail: igorpapalia@hotmail.com

autori anglosassoni) dei nervi periferici, i cui primi studi erano già iniziati all'inizio del XX secolo (1). I risultati sperimentali ottenuti con questa tecnica sono molto incoraggianti, anche se, per il momento, non sono bastati ad indicare il suo impiego in campo clinico.

Un'altra tecnica, il cui interesse è rimasto costante nel secolo scorso, è la Neurotizzazione Muscolare Diretta (DMN), che consente la reinnervazione di un muscolo mediante l'impianto diretto del nervo nel suo ventre.

Per quest'ultima, oltre a quelli sperimentali (2-4), esistono degli incoraggianti risultati clinici (5, 6).

Nel presente lavoro, nell'ottica di ricercare nuove soluzioni per la chirurgia ricostruttiva dei nervi periferici, abbiamo realizzato sperimentalmente una nuova tecnica, impiantato direttamente nel ventre muscolare un innesto di nervo, connesso con sutura termino-laterale ad un nervo donante.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito al Laboratorio di Microchirurgia della École de Chirurgie di Parigi, su 20 ratti femmine, di razza Wistar (peso 230/250 g). I ratti furono allevati e mantenuti nelle medesime condizioni (temp. 21° C, cibo ed acqua ad libitum), operati in anestesia generale (ketamina 40 mg + clorpromazina 3,75 mg/ 250 g.) e suddivisi in due gruppi di 10 individui ciascuno (n. 1 e n. 2)

ANATOMIA (FIG. 1)

Nel ratto Wistar il nervo peroniero comune origina, assieme al nervo tibiale, dal nervo sciatico e, dopo un decorso di circa 25 mm, si divide in due rami terminali, il superficiale ed il profondo. Quest'ultimo fornisce l'innervazione al muscolo tibiale anteriore (ATM). Questo muscolo si trova nella regione antero-laterale della zampa posteriore, origina dal terzo prossimale della tibia e si inserisce nel tarso. Con la sua contrazione eleva il piede.

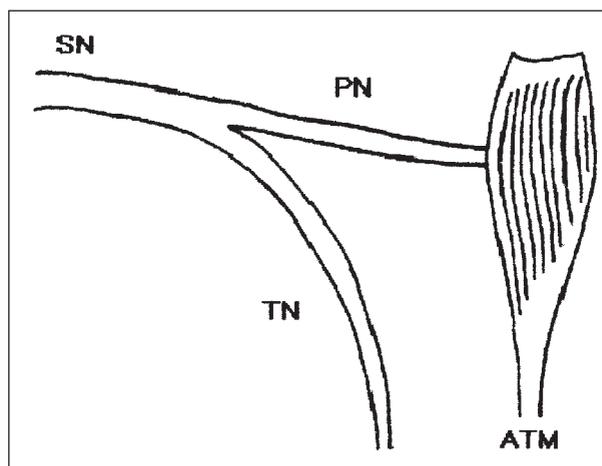


Figura 1. Innervazione normale del muscolo tibiale anteriore del ratto wistar (vista posteriore). SN=nervo sciatico, PN=nervo peroniero, TN=nervo tibiale, ATM=muscolo tibiale anteriore.

Il Nervo tibiale è il ramo di divisione principale del nervo sciatico e fornisce l'innervazione per i muscoli del compartimento posteriore della zampa posteriore.

TECNICA CHIRURGICA

Gruppo n°1

Lato destro: (Fig. 2) il nervo peroniero fu legato e sezionato alla sua origine; l'estremità prossimale fu suturata sul nervo tibiale adiacente, a circa 10 mm dalla sua origine, con tecnica termino-laterale mediante tre punti di nylon 10/0 (Fig. 3).

Successivamente il nervo fu disseccato fino ai suoi rami terminali (superficiale e profondo) che, dopo essere stati sezionati, furono introdotti per circa 1 mm. nel ventre del muscolo tibiale anteriore attraverso una piccola fessura del perimysio e suturati ad esso con un punto di nylon 10/0, qualche millimetro più in alto e lateralmente rispetto al punto in cui l'ATM riceve la sua normale innervazione (Fig. 4).

In questo lato è stata eseguita la tecnica oggetto dello studio.

Lato sinistro: (Fig. 5): il nervo peroniero fu sezionato, asportato per un tratto di circa 1,5 cm ed il

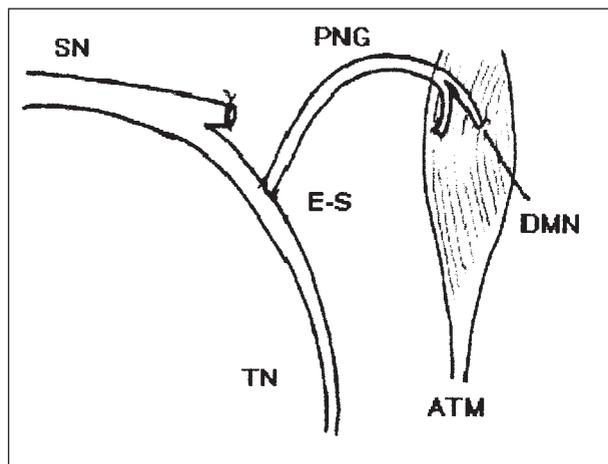


Figura 2. Rappresentazione schematica della tecnica sperimentata (vista posteriore). SN=nervo sciatico, PNG=innesto di nervo peroniero, E-S=sutura termino-laterale, DMN=neurotizzazione muscolare diretta, TN=nervo tibiale, ATM=muscolo tibiale anteriore.

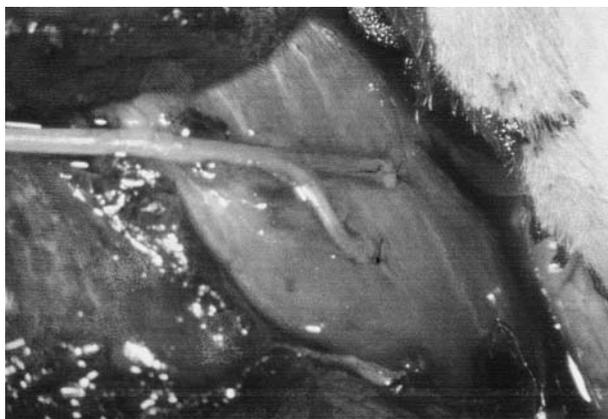


Figura 4. Impianto diretto delle branche superficiale e profonda del nervo peroniero (innesto), direttamente sul muscolo tibiale anteriore.

moncone distale fu ripiegato e suturato nel sovrastante muscolo Gluteus Maximus. In questo modo il muscolo tibiale anteriore sinistro rimase completamente denervato. Questo lato è servito come controllo "denervato".

Gruppo n. 2

Lato destro (Fig. 2): fu eseguita la medesima procedura chirurgica realizzata nel lato destro del 1° gruppo (tecnica di studio).

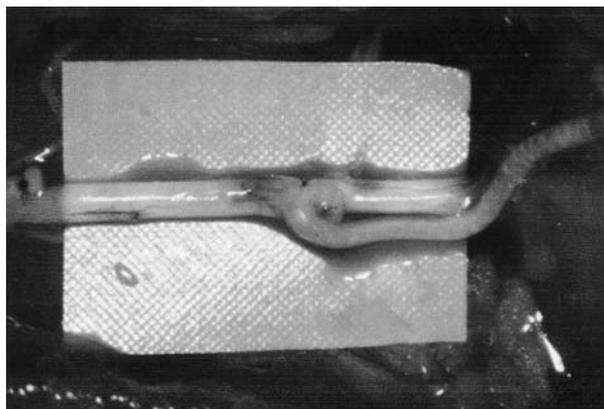


Figura 3. Sutura neuromuscolare dell'innesto di nervo peroniero sul nervo tibiale, dopo apertura dell'epinevrio, con tre punti di nylon 10/0.

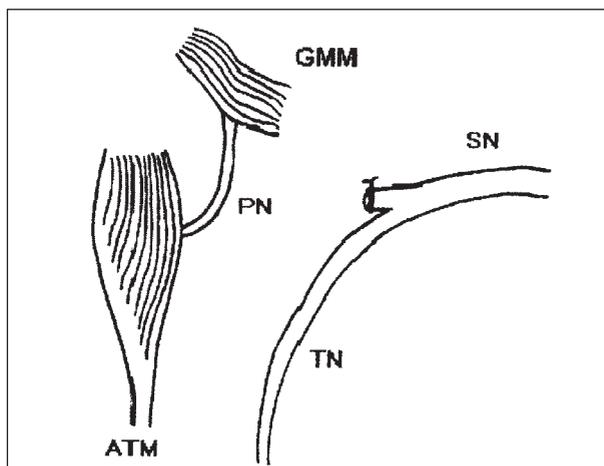


Figura 5. Rappresentazione schematica della tecnica con cui è stato denervato il muscolo tibiale anteriore del lato sinistro del 1° gruppo (vista posteriore). GMM=muscolo gluteo massimo, PN=nervo peroniero, SN=nervo sciatico, TN=nervo tibiale, ATM=muscolo tibiale anteriore.

Lato sinistro (Fig. 6). E' stata mantenuta la normale innervazione del ATM e questo lato è servito come controllo "normale".

Cinque settimane più tardi sono stati sezionati tutti i nervi tibiali del lato destro dei gruppi n. 1 e 2, per escludere il rischio di reinnervazione del ATM a partire dai muscoli circostanti, che conservavano la loro innervazione.

Dopo 16 settimane tutti i ratti furono sacrificati mediante sezione dell'aorta addominale e perfusi con paraformaldeide (PFA) al 4%.

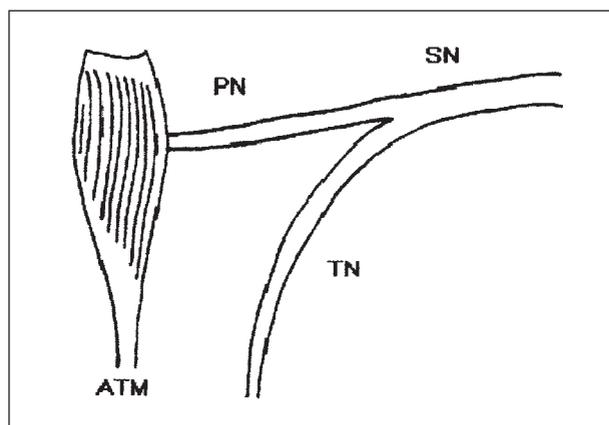


Figura 6. Lato sinistro del gruppo 2. L'innervazione dell'ATM è stata lasciata intatta (vista posteriore). PN=nervo peroniero, SN=nervo sciatico, TN=nervo tibiale, ATM=muscolo tibiale anteriore.

Furono prelevati i seguenti campioni:

- a) i nervi tibiali, la zona della sutura termino-laterale e tutti gli innesti di nervo peroniero del 1° e 2° gruppo;
- b) i nervi peronieri normali del lato sinistro del secondo gruppo;
- c) i muscoli tibiali anteriori del lato destro e sinistro del 1° e 2° gruppo. Essi furono prelevati sezionandoli dalla loro origine fino all'inizio del tendine d'inserzione.

Gli innesti ed i nervi furono fissati in PFA % e d inclusi in paraffina, quindi furono eseguiti dei tagli seriatati (5 μ m) mediante microtomo. Dopo la deparaffinazione, alcune fette furono colorate con tecnica tricromica di Masson, altre con ematossilina-eosina, altre ancora utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per i neurofilamenti (Clone 2F11) (DAKO), con metodo avidina-biotina. L'anticorpo DAKO reagisce con i componenti proteici fosforilati di 200 kDa e 70 kDa delle tre maggiori subunità polipeptidiche (70 kDa, 160 kDa e 200 kDa), presenti nei neurofilamenti dei nervi periferici di topo, ratto e coniglio.

Ciascun muscolo, dopo il suo prelievo, fu pesato usando una bilancia elettronica di precisione e fissato in PFA 4% per una settimana, quindi in una soluzione di saccarosio al 30% per 48 ore. Furono eseguiti dei tagli al congelatore (30 μ m) che furono distesi su

vetrini trattati con poli-L-lisina. Quindi i campioni furono immersi in soluzione di buffer fosfato (200 ml, 0,1 M, Ph 6.0) con acetilcolina-iodide (153,84 mg) per 60 min a 37° C. Quindi fu aggiunto citrato di sodio 0,1M (15,38 ml) solfato di rame 30 mM (30,77 ml), acqua distillata (30,77 ml) e Ferrocianuro di Potassio 5 mM (30,77 ml) e lasciati in immersione per altri 60 min. Il lavaggio in etanolo assoluto per 20 min e la successiva disidratazione completarono la procedura (metodo di Karnovsky & Roots, 1964) (7). Questa tecnica visualizza le strutture proteiche connesse con l'attività anticolinesterasica e consente quindi la visualizzazione delle placche motrici che appaiono con un colore bruno-rossiccio.

Alcuni tagli furono esaminati anche mediante colorazione con ematossilina-eosina.

Tutti i vetrini ottenuti furono esaminati con un microscopio ottico a differenti ingrandimenti e furono prese delle fotografie delle immagini più significative.

RISULTATI

Dei 20 ratti operati, uno del secondo gruppo fu sacrificato il giorno successivo all'intervento per autotomia. Altri tre morirono per cause imprecisate nelle settimane successive.

I 16 rimasti, 9 del primo gruppo e 7 del secondo, arrivarono in buone condizioni alla fine dell'esperimento.

I principali elementi presi in considerazione per valutare i risultati furono:

1. morfologia dei muscoli tibiali anteriori;
2. peso dei muscoli;
3. istologia dei nervi;
4. istologia dei muscoli.

1) *Morfologia dei muscoli tibiali anteriori*

a) Gruppo n. 1: tutti i muscoli del lato destro (operati, Fig. 7 OS) mostravano le caratteristiche dei muscoli trofici, con aspetto fusiforme e presentavano un volume ed uno spessore circa doppio rispetto a quelli del lato opposto. I muscoli del lato sinistro (denervati, Fig. 7 DS) avevano un aspetto

nastriforme ed un colore pallido, tipici della denervazione.

b) Gruppo n. 2: i muscoli del lato destro (Fig. 8 OS) avevano le stesse caratteristiche di quelli del gruppo n. 1 ma, confrontati con quelli del lato sinistro (normali, Fig. 8 NS) mostravano un volume ed uno spessore di circa un terzo, pur avendone lo stesso colore e forma.

2) *Peso dei muscoli*

I pesi di ciascun muscolo sono riportati nella tabella 1. Su questi valori è stato eseguito un t-test utilizzando il programma Excel di Microsoft su un PC computer. Il valore di $p < 0.05$ fu considerato statisticamente significativo.

E' stata rilevata una differenza significativa tra i pesi dei muscoli operati (media $0,21 \pm 0,02$) in rapporto al peso di quelli denervati ($0,094 \pm 0,02$) e di quelli normali ($0,59 \pm 0,02$) ($p < 0,01$).

Fu calcolata anche la media matematica di tali misure che mostrò un recupero del 35,6% di peso dei muscoli operati rispetto a quelli normali, mentre in quelli denervati il peso scendeva al 15,9% (tabella 2).

3) *Istologia dei nervi*

Nei preparati istologici dei nervi furono rilevate le seguenti osservazioni:

a) vi era una certa fibrosi a livello della sutura termino-laterale che nell'innesto;

Tabella 1. *Peso dei muscoli (g).*

Ratto n.	ATM destro (Gruppo 1, 2)	ATM sinistro (Gruppo 1)	ATM sinistro (Gruppo 2)
1	0.218	0.064	
2	0.208	0.096	
3	0.22	0.103	
4	0.24	0.108	
5	0.18	0.08	
6	0.173	0.072	
7	0.198	0.07	
8	0.213	0.106	
9	0.258	0.075	
11	0.203		0.58
12	0.25		0.58
13	0.2		0.57
14	0.214		0.58
15	0.224		0.585
16	0.219		0.59
17	0.221		0.62
Media ± S.D.	0.21 ± 0.02	0.094 ± 0.02	0.59 ± 0.02

b) i neurofilamenti furono osservati in tutti gli innesti di nervo peroniero esaminati con tecnica immunoistochimica, sia a livello sutura (Fig. 12) che nelle porzioni più distali dell'innesto (Fig. 13); tuttavia essi sembravano meno numerosi rispetto a

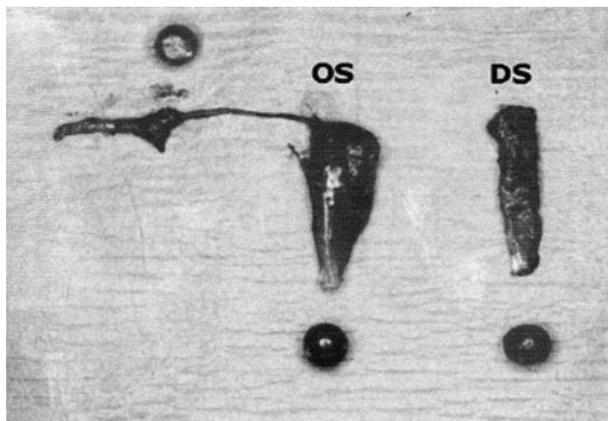


Figura 7. *Aspetto dei muscoli tibiali anteriori prelevati dal 1° gruppo. OS=muscolo operato e reinnervato, DS= muscolo denervato.*

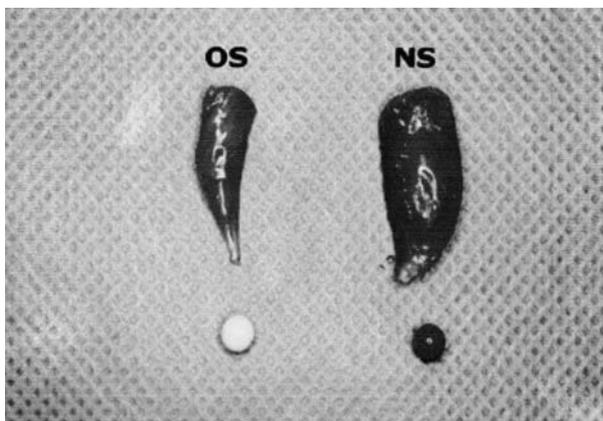
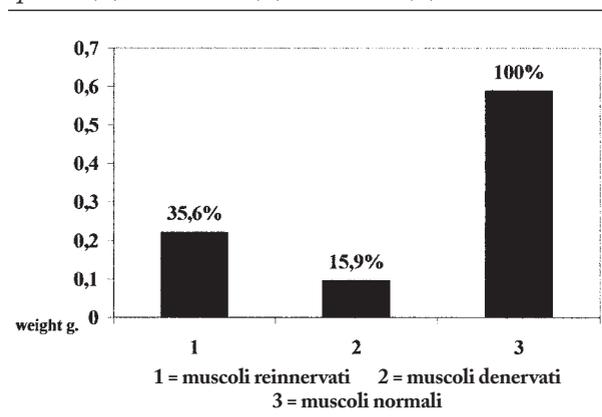


Figura 8. *Aspetto dei muscoli tibiali anteriori prelevati dal 2° gruppo. OS=muscolo operato e reinnervato, NS= muscolo normale.*

Tabella 2. Confronto in percentuale dei pesi muscoli operati (1), denervati (2) e normali (3)



quelli osservati nei nervi peronieri normali del lato sin. del 2° gruppo.

4) Istologia dei muscoli

a) Lato destro del primo e secondo gruppo (Fig. 9). La maggior parte delle fibre dei muscoli osservati apparivano normali. Nelle zone più periferiche si rilevavano poche fibre atrofiche. Le placche motrici erano numerose, raggruppate e di dimensioni variabili e ciò era probabilmente dovuto alla contemporanea presenza di placche normali e placche degenerate.

b) Lato sinistro del primo gruppo (Fig. 10). Le fibre dei muscoli denervati erano atrofiche e im-

merse in tessuto adiposo. Le placche motrici erano di piccole dimensioni, di aspetto granulare e frammentate, elementi tipici della degenerazione.

c) Lato sinistro del secondo gruppo (Fig. 11). Le placche motrici avevano una disposizione uniforme, erano voluminose con forma ovalare e contorni regolari.

Esaminando obbiettivamente i ratti del primo gruppo, prima del loro sacrificio, è stato rilevato un dato interessante. Sollevandoli dal dorso si notava che il piede della zampa sinistra cadeva in completa estensione mentre quello della zampa destra manteneva una posizione in semiflessione dorsale, che manteneva anche dopo una estensione forzata.

DISCUSSIONE

L'analisi dei dati ci dimostra che la tecnica sperimentata ha consentito una reinnervazione del muscolo tibiale anteriore che era stato in precedenza completamente denervato. Questa reinnervazione era dovuta alla rigenerazione di assoni provenienti dal nervo tibiale, che hanno attraversato la sutura termino-laterale, quindi l'innesto di nervo peroniero, la sutura neuromuscolare e infine, giunti in contatto con le fibre muscolari, hanno formato nuove giunzioni neuromuscolari.

L'idea di realizzare una tecnica di questo tipo ci è venuta analizzando gli interessanti risultati speri-

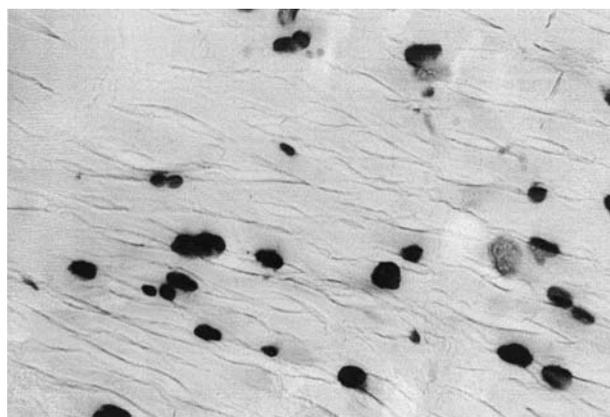


Figura 9. Aspetto delle placche motrici osservate in un muscolo reinnervato (10X). Colorazione di Karnowsky & Roots (vedi testo).



Figura 10. Aspetto delle placche motrici osservate in un muscolo denervato (10X). Colorazione di Karnowsky & Roots (vedi testo)

mentali descritti in letteratura (2, 3, 8-12) con le suture termino-laterali (o forse più correttamente "latero-terminali", secondo quanto suggerito da Gatta (13) già nel 1938). Viterbo (14) ha sperimentato questa tecnica anche nella pratica clinica per il trattamento delle paralisi del nervo facciale, ottenendo dei risultati incoraggianti.

Abbiamo visto pure che con l'impianto diretto di un nervo sul muscolo (direct muscular neurotization, DMN, degli autori anglosassoni) era possibile, sia sperimentalmente (15, 16) che clinicamente (5, 6,), la neurotizzazione e la reinnervazione funzionale di un muscolo. Brunelli (1993) (17) ha de-

scritto la sua esperienza con 51 pazienti, che avevano subito una distruzione traumatica o chirurgica della porzione neurale o del nervo dei muscoli studiati. In 46 di essi, egli ottenne un recupero motorio di tipo M4 o M5. Anche Mackinnon (1993) (6) ha utilizzato in un caso questa metodica con successo, recuperando l'innervazione di un muscolo gastrocnemio.

Era ragionevole quindi, aspettarci che la nostra tecnica potesse dare dei risultati positivi.

Nella nostra ricerca, l'aspetto di ciascuno dei muscoli operati (Fig. 7, 8) non lasciava alcun dubbio sulla loro avvenuta reinnervazione, anche se il

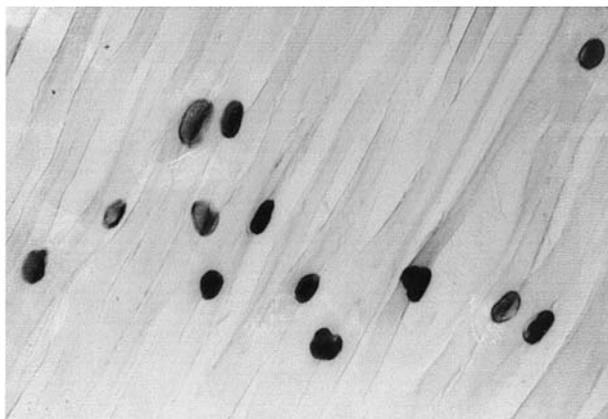


Figura 11. Aspetto delle placche motrici osservate in un muscolo normale (10X). Colorazione di Karnowsky & Roots (vedi testo).

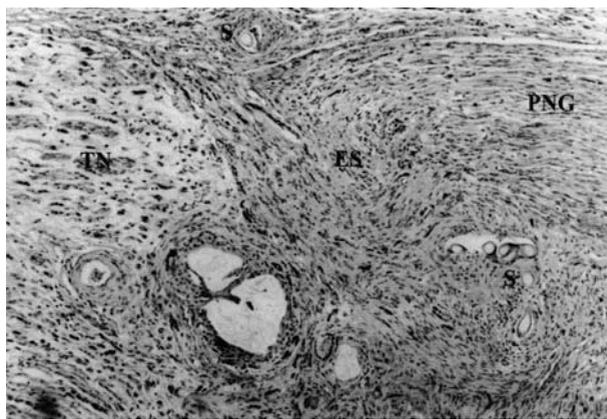


Figura 12. Sezione longitudinale dell'area della sutura termino-laterale (T-L) (6,3X). S=punti di nylon, TN=nervo tibiale, ES=zona della sutura T-L, PNG=innesto di nervo peroniero, Colorazione immunostochimica con kit DAKO (vedi testo).

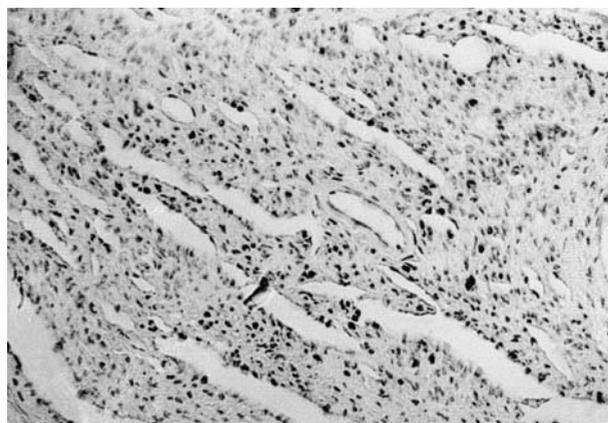


Figura 13. Sezione trasversale di un innesto di nervo. Scarsa quantità di assoni (25X). Colorazione immunostochimica con kit DAKO (vedi testo).

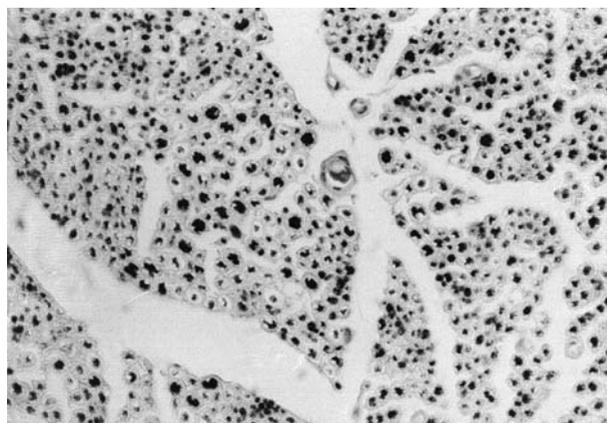


Figura 14. Sezione trasversale di un innesto di nervo. Buona quantità di assoni (25X). Colorazione immunostochimica con kit DAKO (vedi testo).

loro peso e volume era inferiore a quello dei muscoli normali (Tab. 1).

Sappiamo sperimentalmente che esiste la possibilità che un muscolo possa essere reinnervato da altri adiacenti, mediante un meccanismo di neurotizzazione "muscolo/muscolare" (15, 16, 18). E' per questo motivo che abbiamo proceduto, dopo 5 settimane alla sezione del nervo tibiale in tutte le zampe operate con la tecnica descritta, lasciando tutti i muscoli circostanti al tibiale anteriore completamente denervati. Inoltre se tale evenienza si fosse verificata sarebbe stata osservata anche nel lato sinistro del gruppo n. 1, fatto questo che non è avvenuto.

Istologicamente, negli innesti di nervo peroniero si è osservata una quantità minore di assoni rispetto ai nervi peronieri normali. Ciò consente comunque una reinnervazione dei muscoli probabilmente mediante gli stessi meccanismi che regolano il fenomeno dell'adozione. forse la minore quantità di assoni ricresciuti negli innesti era dovuta alla fibrosi che si è contemporaneamente osservata.

Le placche motrici, alcune degenerate altre di aspetto normale, furono osservate in tutti i muscoli prelevati dal lato destro sia del primo che del secondo gruppo, in cui era stata eseguita la tecnica. Le placche motrici, a seguito della degenerazione walleriana degli assoni cui fanno capo, vanno incontro anch'esse ad un processo di degenerazione che inizia già nei primi giorni e si continua per diversi mesi fino alla loro completa scomparsa (19, 20). Queste modificazioni possono essere rilevate evidenziando le proteine connesse all'attività colinesterasica, come è stato fatto nel nostro studio, utilizzando la tecnica di Karnowsky e Roots. A distanza di quattro mesi tali elementi erano ancora visibili tra placche motrici di aspetto normale, queste ultime formatesi ex novo per riabitazione di placche "orfane".

Abbiamo riportato tra i risultati, l'osservazione della differente posizione delle zampe posteriori del lato destro e sinistro del primo gruppo. L'evidenza che nel lato destro il muscolo tibiale anteriore mantiene sollevato il piede, non ci porta certo a credere ad un controllo volontario di questo movimento, ma ci suggerisce la presenza, per lo meno, di un tono muscolare, che può risultare soltanto da un reale funzionamento della giunzione neuromu-

scolare (ossia la placca motrice) nel muscolo in esame. Lo studio di movimenti volontari nell'animale da esperimento, si esegue con test specifici come il Grasping Test (21), che risultano però dall'azione sinergica di un intero gruppo muscolare. Tali test erano inapplicabili nella nostra ricerca, in cui è stato esaminato un solo muscolo.

CONCLUSIONI

La tecnica chirurgica sperimentata in questa ricerca, basata sull'associazione di una sutura termino-laterale e di una neurotizzazione muscolare diretta (DMN) hanno consentito il recupero della reinnervazione, del trofismo e del tono nel muscolo esaminato, privato in precedenza di qualsiasi connessione nervosa, senza la necessità di sacrificare altri nervi motori.

Questi risultati ci incoraggiano a proseguire questi studi al fine di migliorare gli aspetti tecnici della metodica e di valutarne la sua eventuale utilizzazione in campo clinico.

Tuttavia il dubbio che rimane riguarda la possibilità che in una reinnervazione di questo tipo possa essere esercitato un controllo volontario.

BIBLIOGRAFIA

1. Balance CA, Balance HA, Stewart P. Remarks on the operative treatment of chronic facial palsy of peripheral origin. *Br Med J* 1903; 1: 1009-13.
2. Viterbo F, Trinidad JC, Katsumasa H, Mazzoni A. End-to-side neurotization with removal of the epineural sheath: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94: 1038-47.
3. Lundborg, G, Zhao, Q, Kanje M, Danielsen N. Can sensory and motor collateral sprouting be induced from intact peripheral nerve by end-to-side anastomosis? *J Hand Surg* 1994; 19: 277-82.
4. Heineke H. Die direkte Einpflanzung des Nerven in den muskel. *Zentralblatt für Chirurgie* 1914; 41:465.
5. Brunelli G. Direct neurotization of severely damaged muscles. *J Hand Surg* 1982; 7: 572-79.
6. Mackinnon SE, McLean JA, Hunter GA. Direct muscle neurotization recovers gastrocnemius function. *J Reconstr Microsurg* 1993; 9: 77-80.

7. Karnovsky MJ, Roots L. A "direct coloring" Thiocholine method for Cholinesterase. *Cytochemistry* 1964; 70: 617-22.
8. Noah EM, Williams A, Jorgenson C, Skoulis TG, Terzis JK. End-to-side neurorraphy: A histologic and morphometric study of axonal sprouting into an end-to-side nerve graft. *J Reconstr Microsurg* 1997; 13: 99-106.
9. Zhao JZ, Chen ZW, Chen TY. Nerve regeneration after termino-lateral neurorraphy: experimental study in rats. *J Reconst Microsurg* 1997; 13: 31-7.
10. Kalliainen LK, Cederna PS, Kuzon WM. Mechanical function of muscle reinnervated by end-to-side neurorraphy. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103: 1919-26.
11. Bertelli JA, Soares dos Santos AR, Calixto JB. Is axonal sprouting able to traverse the conjunctival layers of the peripheral nerve? A behavioral, motor and sensory study of end-to-side nerve anastomosis. *J Reconstr Microsurg* 1996; 12: 559-63.
12. Rowan PR, Chen LE, Urbaniak JR. End-to-side nerve repair. A review. *Hand Clinics* 2000; 16/1: 151-9.
13. Gatta R. Sulla anastomosi latero-terminale dei tronchi nervosi. *Arch Ital Chir* 1938; 48: 155-61.
14. Viterbo F. Les anastomoses nerveux termino-lateral. In 34^e Congres de la Societè Française de Chirurgie de la Main. Paris 10-12 Dec. 1998.
15. Frey M, Gruber H, Holle J, Freilinger G. An experimental comparison of the different kinds of muscle reinnervation: nerve suture, nerve implantation, and muscular neurotization. *Plast Reconstr Surg* 1982; 69: 656-67.
16. McNamara M, Garrett WE jr, Seaber AV, Goldner JL. Neurorraphy, nerve grafting, and neurotisation: a functional comparison of nerve reconstruction techniques. *J Hand Surg* 1987; 12A: 354-60.
17. Brunelli GA, Brunelli GR. Direct muscle neurotization. *J Reconstr Microsurg* 1993; 9: 81-90.
18. Dellon AL, Mackinnon S.E. Reanimation following facial paralysis by adjacent muscle neurotization: experimental model in the primate. *Microsurgery* 1989; 10: 251-5.
19. Gruber H, Freilinger G, Holle J, Mayr R. Motor endplates in autologous muscle transplants. *Experientia* 1974; 30: 1191-2.
20. Saito A, Zacks SI. Fine structure of neuromuscular junctions after nerve section and implantation of nerve in denervated muscle. *Experimental and Molecular Pathology* 1969; 10: 256-73.
21. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Methods* 1995; 58 (1-2): 151-5.