

STUDIO MORFOLOGICO SULLA DEGENERAZIONE E RIGENERAZIONE DELLE FIBRE NERVOSE CUTANEE IN RELAZIONE AL TEMPO DI DENERVAZIONE

A. SCEVOLA¹, R. GILARDI², S. RAIMONDO³, S. GEUNA³, I. PAPALIA⁴, B. BATTISTON¹, M. STELLA¹, P. TOS¹

¹UOD Microchirurgia Ricostruttiva - Chirurgia Plastica - Ospedale C.T.O. di Torino

²Policlinico di Modena - Ecole de Chirurgie, Paris

³Dipartimento Scienze Cliniche e Biologiche Università di Torino

⁴Dipartimento di Discipline Chirurgiche Generali e Speciali, Università di Messina

Vincitore del Premio Rossoni - 43° Congresso SICM - Perugia, 2005

Morphological study on skin nerve fibers degeneration and regeneration after different times of denervation

SUMMARY

Aim of the study: *The objective of this study was to partially fill some of these gaps by focusing on the modifications occurring to free sensory fibers and to the fibers innervating Meissner's corpuscles. Materials and methods:* *The rat upper limb was employed in this study's experimental model. In particular, the left median nerve was chosen in order to study the denervation and the reinnervation of cutaneous fibers of the ipsilateral limb. Twenty-four Wistar female adult rats were used, divided in three groups. In the first group (8 rats, separated in 4 sub-groups), denervation without surgical repair was executed in order to study nerve fiber degeneration in relation to different times of denervation (5, 10, 15 and 30 days). In the second group of animals (12 rats divided into 4 sub-groups), the dissected nerve was repaired by means of an autologous graft performed immediately after lesion or delayed for 1, 2 and 4 months. The third group as represented by the healthy control group. Two months after the nerve repair, the skin of the 2nd, 3rd and 4th fingers was analyzed by means of immunocytochemistry and confocal laser microscopy. Results:* *The immunocytochemical analysis with the anti-PGP 9.5 antibody (axonal marker) showed that the cutaneous nerve fibers disappear in the rat very prematurely (already at 30 days). After immediate surgical repair, the nerve fibers reinnervate the denervated skin and reach the superficial layer of the derma within 2 months. While there are no significant differences between the one-month-delay nerve repairs and immediate repair group, the fibers did not reach the superficial derma in the groups reinnervated after 2 and 4 months, resulting in a partial innervation defect. Conclusions:* *This study suggests that nerve repair should be performed within 1-2 months after the lesion in the rat to obtain a better morphological nerve regeneration pattern. After this lapse of time, morphological reinnervation changes occur, which can result in unsatisfactory results. Riv Chir Mano 2005; 2: 96-104*

KEY WORDS

Nerve regeneration, denervation, sensory cutaneous fibres, PGP 9.5

RIASSUNTO

Scopo dello studio: *L'obiettivo di questo studio è quello di colmare alcune di queste lacune focalizzando l'attenzione in particolare sull'innervazione dei corpuscoli di Meissner e sulle terminazioni sensitive libere. Materiali e metodi:* *È stato impiegato il modello sperimentale rappresentato dall'arto superiore del ratto; in particolare si è utilizzato il nervo mediano di sinistra per studiare la denervazione e la reinnervazione delle fibre cutanee della zampa corrispondente. Sono stati impiegati 24 ratti Wistar, femmine, adulti divisi in tre gruppi. Nel primo gruppo (8 rat-*

Arrived: 10 March 2005

Accepted: 15 June 2005

Correspondence: Dr. Pierluigi Tos, Via Saluzzo 23 bis, 10125 - Torino - Tel: 011-6696875 - Fax: 011-6963662

E-mail: pierluigi.tos@unito.it

ti divisi in 4 gruppi) è stata eseguita la denervazione senza riparazione chirurgica e si sono studiati i fenomeni degenerativi cutanei a tempi diversi di denervazione: 5, 10, 15 e 30 giorni. Nel secondo gruppo di animali (12 ratti divisi in 4 gruppi) il nervo lesionato è stato riparato mediante innesto autologo immediato e differito a 1, 2 e 4 mesi. Il terzo gruppo è rappresentato dal gruppo di controllo sano. Due mesi dopo la riparazione nervosa si è analizzata la cute del II, III e IV dito mediante tecnica immunocitochimica e microscopia laser confocale. **Risultati:** L'analisi immunocitochimica con anticorpo anti-PGP 9.5 (marker assonale) evidenzia che le fibre nervose cutanee scompaiono nel ratto molto precocemente (già a 30 giorni). Dopo riparazione chirurgica, le fibre nervose reinnervano la cute denervata e, in seguito a riparazione immediata, raggiungo nuovamente lo strato papillare del derma nell'arco di 2 mesi. Mentre nel caso di riparazione dilazionata di 1 mese non si notano cambiamenti significativi, nei gruppi reinnervati dopo 2 e 4 mesi si osserva un difetto parziale di innervazione, in quanto le fibre non raggiungono il derma superficiale. **Conclusioni:** Questo studio indicherebbe come nel ratto la riparazione effettuata entro 1-2 mesi dalla lesione dia il miglior quadro morfologico di reinnervazione sensitiva. Dopo questo lasso di tempo si determinino delle modificazioni morfostrutturali nella reinnervazione che potrebbero essere la causa dei non sempre brillanti risultati.

PAROLE CHIAVE

Rigenerazione nervosa, denervazione, fibre cutanee sensitive, PGP 9.5

INTRODUZIONE

Il corretto recupero della sensibilità cutanea e della funzione motoria sono i principali criteri da considerare per valutare il successo di un intervento di riparazione nervosa in chirurgia ricostruttiva. È dunque molto importante approfondire e comprendere le modificazioni che si verificano a carico dei tessuti periferici (muscoli e cute) in seguito a denervazione prolungata. Queste modificazioni morfostrutturali possono condizionare gli eventi rigenerativi e quindi spiegare gli eventuali risultati clinici insoddisfacenti. Questo tipo di indagine sperimentale può inoltre fornire uno spunto interessante per nuovi studi sulle tecniche di "protezione" dalla denervazione degli organi bersaglio e guidare nuove strategie ricostruttive.

Per ciò che concerne il muscolo, molti studi hanno dimostrato la presenza di importanti variazioni morfostrutturali in seguito a denervazione che giungono fino all'atrofia completa della muscolatura striata (1). Questo ha indirizzato i chirurghi verso una riparazione precoce dei nervi lesionati (di norma la reinnervazione/riparazione deve avvenire entro un anno). Al contrario, le modificazioni cui vanno incontro nel tempo le fibre sensitive cutanee dopo denervazione sono ancora in larga misura

oscuri. In particolare, risultano ancora poco approfonditi i dati sulla cinetica di denervazione e reinnervazione dei recettori cutanei e mancano osservazioni a lungo termine sulle alterazioni a carico dei recettori denervati.

Diversi autori nel secolo passato hanno studiato la cute con svariate metodiche, ma esclusivamente per chiarire la struttura e l'ultrastruttura delle fibre nervose e dei corpuscoli sensitivi. Tra i lavori più completi riguardo all'innervazione cutanea ci sono quelli di Halata e Munger per la particolare attenzione rivolta alla classificazione delle strutture recettoriali cutanee (2, 3).

I primi studi reperibili in letteratura riguardo ai cambiamenti degenerativi dei corpuscoli sono riferibili a Brown ed Iggo (4). Tuttavia le ricerche più approfondite sono state svolte da Zelena e da Ide a partire dagli anni settanta. Ide in particolare ha svolto una serie di lavori utilizzando gruppi sperimentali molto numerosi ma perdendo gran parte degli animali operati a causa di ulcere le quali rendono, ovviamente, impossibile lo studio morfologico della cute dell'arto operato (5, 6).

I cambiamenti che avvengono durante la fase di denervazione dimostrano la stretta dipendenza dei tessuti bersaglio dal sistema nervoso periferico. Il grado di questa dipendenza varia con il tipo di re-

cettore studiato, la specie animale e l'età (7-12). Tra i recettori dei mammiferi, la maggior parte dei recettori sensitivi si conserva in seguito a denervazione, anche se si osservano importanti cambiamenti morfologici.

Inoltre, da un punto di vista strettamente metodologico, un fattore importante da tenere in considerazione nell'analisi della letteratura è la tecnica utilizzata per realizzare la lesione nervosa. Alcuni autori utilizzano la tecnica della sezione del nervo, che porta ad una completa deafferentizzazione dell'area da studiare (5, 6, 14, 15), mentre altri autori effettuano la legatura o lo schiacciamento del nervo (16). Questa ultima metodica non sempre determina una completa denervazione cutanea potendo così inficiare il disegno sperimentale. Vi è consenso invece sul fatto che i corpuscoli sensitivi cutanei, qualora degenerati, non possono essere indotti de novo dalla fibra nervosa (5).

Il punto più controverso, circa lo studio della reinnervazione cutanea, è a tutt'oggi la determinazione del tempo limite entro il quale i corpuscoli sensitivi possono essere validamente reinnervati (14).

Sulla base di queste premesse, obiettivo di questo studio è stato quello di studiare la degenerazione delle fibre nervose cutanee a tempi diversi dalla lesione nervosa e, in seguito, la loro rigenerazione dopo tempi differenti di denervazione. In particolare, si sono studiate le modificazioni strutturali cui vanno incontro le fibre libere e le fibre dirette ai corpuscoli di Meissner implicati nella sensibilità tattile epicritica.

MATERIALI E METODI

Per questo studio è stato utilizzato il modello sperimentale rappresentato dall'arto superiore di ratto. Sono stati utilizzati 24 ratti Wistar adulti, femmine, del peso di circa 200-225 gr. Ogni animale è stato operato in anestesia profonda, effettuata con 0,6 ml di una miscela realizzata con 10 ml di ketamina (penpaharma, 50 mg/ml[®]) ed 1,5 ml di carbamazepina (Largactil, 5 mg/ml[®]).

I ratti sono stati suddivisi in 3 gruppi A, B e C. Il gruppo A (8 ratti) è stato approntato per lo stu-

dio sulla denervazione, il gruppo B (12 ratti) per lo studio della reinnervazione e il gruppo C rappresenta il gruppo di controllo (4 ratti).

Gli animali dei gruppi A e B sono stati suddivisi in 4 sottogruppi rispettivamente. Per lo studio della cute denervata (gruppo A) sono stati realizzati quattro sottogruppi di due ratti ciascuno che sono stati denervati (nervo mediano e ulnare) e sacrificati a 5, 10, 15 e 30 giorni rispettivamente dalla denervazione.

Per studiare la risposta cutanea alla reinnervazione (gruppo B) gli animali, suddivisi in quattro sottogruppi sperimentali, sono stati denervati (nervo mediano e ulnare) e reinnervati (solo nervo mediano) come segue: gruppo B0 (riparazione immediata), gruppo B1 (riparazione dopo 1 mese), gruppo B2 (riparazione dopo 2 mesi) e gruppo B4 (riparazione a 4 mesi). In ogni sottogruppo la reinnervazione è stata realizzata con il medesimo protocollo operatorio: nello specifico l'innesto di nervo mediano è stato prelevato dall'arto controlaterale, girato di 180° e suturato ai monconi del nervo mediano precedentemente sezionati.

Ogni gruppo è stato sacrificato 2 mesi dopo l'intervento di riparazione. Dopo il sacrificio è stata prelevata la cute palmare del II, III e IV.

Il gruppo C, il gruppo di controllo, è rappresentato da 4 ratti non operati che sono serviti per studiare la normale innervazione cutanea delle dita.

Tecnica chirurgica

Previa preparazione del campo e depilazione dell'arto, si procede con un'incisione longitudinale anteriore sull'arto superiore sinistro (dal capezzolo al gomito). Si individua quindi il muscolo grande pettorale, al di sotto del quale emergono i nervi ulnare e mediano in senso medio-laterale, e, con l'ausilio del microscopio, si esegue un'attenta dissezione e preparazione del campo operatorio al fine di risparmiare l'arteria brachiale e la vena basilica ed evitare alterazioni periferiche dovute all'ischemia.

Si sezionano poi bilateralmente il nervo mediano ed il nervo ulnare, rimuovendo un segmento di circa un centimetro e fissando il capo prossimale di ciascun nervo al di sotto del muscolo grande petto-

rale per prevenire una eventuale reinnervazione spontanea.

Negli animali del gruppo B, il nervo mediano è stato riparato mediante innesto nervoso autologo a tempi diversi dalla denervazione come descritto nel paragrafo precedente. Il nervo, prima di essere riparato, è stato esaminato per verificare che non vi fosse stata una reinnervazione precoce tra i due monconi e si è proceduto quindi alla recentazione dei due monconi nervosi ed alla riparazione del gap residuo con un innesto da nervo mediano controlaterale girato di 180° e suturato con 3-4 punti in Nylon 10/0 per ogni parte.

Analisi strutturale

Al momento del prelievo, i campioni di cute delle dita sono stati fissati in paraformaldeide al 4% per 2 ore e lavati successivamente in PBS (phosphate buffered saline) dove sono stati conservati fino al momento dell'inclusione in paraffina oppure in ghiaccio (OCT).

Per le inclusioni in paraffina si è seguita una metodica di routine.

Per le inclusioni in OCT, i campioni sono stati preventivamente crioprotetti con dei passaggi in soluzioni a concentrazioni crescenti di saccarosio (7,5% - 15% - 30%) in PBS 0,1 M, e quindi con un passaggio in una soluzione 1:1 di OCT e PBS al 30% di saccarosio.

Per i campioni inclusi in paraffina sono state eseguite sezioni con microtomo rotativo RM 2135 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany).

Per le inclusioni in OCT, i campioni sono stati mantenuti a -80°C, fino al momento del taglio eseguito con un criostato CM 1900 (Leica Microsystems, Munchen, Germany).

Sono state quindi allestite quattro serie di sei vetrini, ognuno contenente 4 sezioni consecutive dello spessore di 10 µm. Si sono poi eseguite due colorazioni istologiche classiche, (ematossilina ed eosina e la tricromica di Papanicolau) e l'analisi immunohistochimica. Per quest'ultima sono stati utilizzati due marker assonali, l'a-PGP 9.5 e l'a-neurofilamento (NF) e due marker gliali, l'a-GFAP e l'a-S-100. Le sezioni sono state incubate con gli

anticorpi primari anti-PGP 9.5 (Policlonale in rabbit, 1:4000 in PBS, Sigma, St. Louis, Mo), anti-neurofilamento (Monoclonale in mouse, 1:200 in PBS, Sigma, St. Louis, MO), anti-S-100 (Policlonale in rabbit, 1:800 in PBS, Sigma, St. Louis, MO), anti-GFAP (Monoclonale in mouse, 1:400 in PBS, DAKO, Milano, Italia) diluiti in siero normale della specie in cui è prodotto l'anticorpo secondario (1:100) e PBS (0,01M, pH 7.4) addizionato di Triton 0,1% per 12-14 ore a temperatura ambiente e in atmosfera umida. Vengono quindi eseguiti due lavaggi di 10 minuti in PBS e l'incubazione di un'ora con l'anticorpo secondario fluorescente. Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati il CY3-conjugated (anti-rabbit, 1:400, Jackson ImmunoResearch) per l'a-PGP 9.5 e l'a-S100, l'ALEXA Fluor 488 conjugated (anti-mouse, 1:500, Molecular probes, Eugene, Oregon) per l'a-neurofilamento e l'a-GFAP. Dopo un lavaggio in PBS i vetrini sono stati montati mediante il *fluorescent mounting medium* (Dako, Milano, Italia).

Si è infine proceduto all'analisi qualitativa e semiquantitativa delle sezioni al microscopio ottico e al microscopio laser confocale (LSM-510, Zeiss, Jena, Germany).

RISULTATI

La dissezione anatomica eseguita sui ratti normali (gruppo C) ha permesso di evidenziare che il nervo mediano innerva le prime 4 dita, mentre l'ulnare innerva l'ultimo dito. Tuttavia, è stato anche reperito un ramo del nervo mediano per il quinto dito (anastomosi mediano-ulnare) (Fig. 1), la cui esistenza è confermata anche da altri autori (17).

Dal punto di vista metodologico, l'analisi strutturale della cute denervata ha dimostrato che l'inclusione in paraffina è migliore per le colorazioni classiche, quali l'ematossilina ed eosina (Fig. 2) e la tricromica secondo Papanicolau, mentre la resa dell'immunohistochimica è sensibilmente maggiore dopo inclusione in ghiaccio (OCT). Inoltre, tra i vari anticorpi utilizzati, la PGP 9,5 si è rivelata essere il miglior marker per lo studio delle fibre nervose cutanee in rigenerazione (Fig. 3). L'anticorpo anti-

neurofilamento invece non marca le fibre più piccole e superficiali pare essere, quindi, più utile per lo studio dei tronchi nervosi di grande calibro. Per ciò che concerne i marcatori gliali, l'anticorpo anti-GFAP monoclonale da noi utilizzato non ha dato buoni risultati mentre l'anticorpo anti-S-100 si è rivelato molto utile in associazione alla PGP 9,5 per studiare le fibre in condizioni di denervazione in quanto evidenzia le cellule di Schwann.

Focalizzando quindi la nostra attenzione sui risultati dell'analisi immunohistochimica in seguito a denervazione, è stato possibile evidenziare che le fibre nervose cutanee vanno incontro a rapida degenerazione e scompaiono molto precocemente. A 5 giorni è possibile vedere le fibre rigonfiarsi e disor-

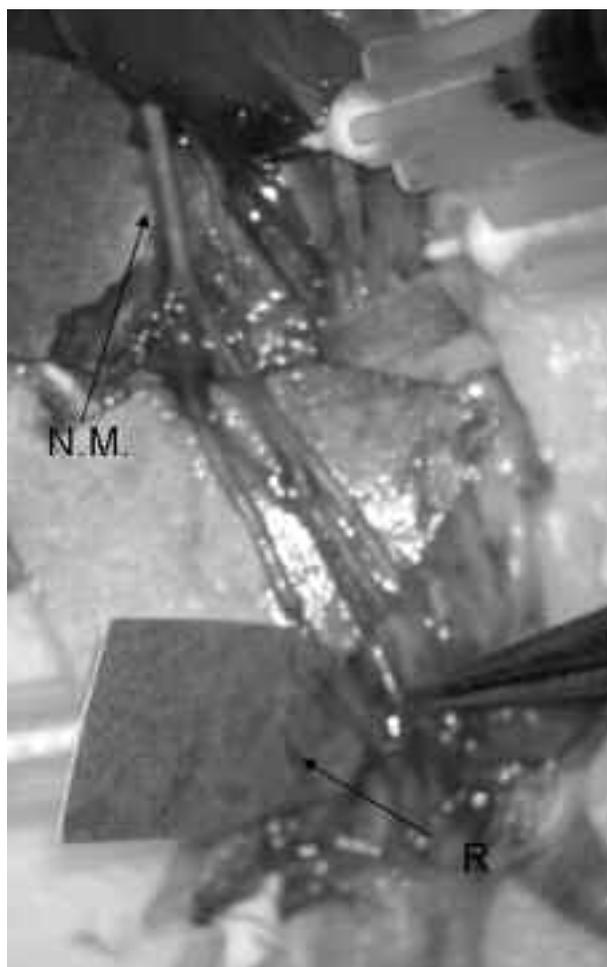


Figura 1. Dissezione anatomica al microscopio del nervo mediano (N.M.) e dei suoi rami (dal gomito alla mano). Variante anatomica (R) ramo diretto al V dito.

ganizzarsi (degenerazione Walleriana). A 10 e 15 giorni, i preparati sono simili, con la presenza di fibre disorganizzate soprattutto nel derma profondo, mentre a livello superficiale la cute appare quasi totalmente priva di marcatura. A 30 giorni di denervazione i preparati appaiono completamente privi di fibre. In questo stesso stadio, l'S100 ha invece permesso di evidenziare un aumento delle cellule di Schwann ed alcune immagini possono essere riferibili alle cellule lamellari dei corpuscoli denervati.

Per ciò che concerne l'analisi immunohistochimica delle fibre rigenerate nella cute, i risultati mostrano che nei preparati del gruppo reinnervato immediatamente (gruppo B0) sono presenti fibre nervose rigenerate (marcate con il PGP 9,5) in prossimità della giunzione dermo-epidermica. Alcune di esse sono localizzate dentro a corpuscoli di Meissner lungo l'asse delle papille dermiche.

In caso di riparazione dopo un mese (gruppo B1) (Fig. 4) sono presenti numerose fibre nervose

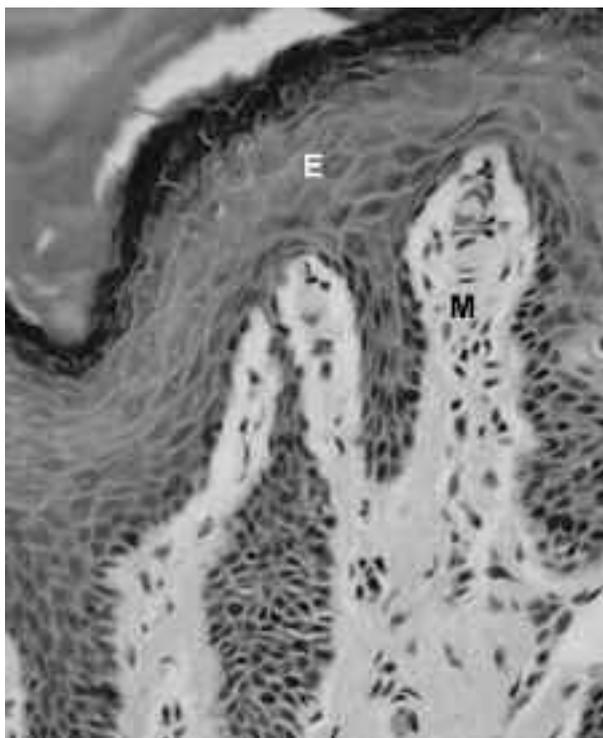


Figura 2. Sezione di cute normale inclusa in paraffina, tagliata perpendicolarmente alla superficie e colorata con ematossilina ed eosina. Si nota chiaramente sotto l'epidermide (E) lo strato papillare del derma nel quale possono essere individuati corpuscoli di Meissner (M). Ingrandimento 500X.

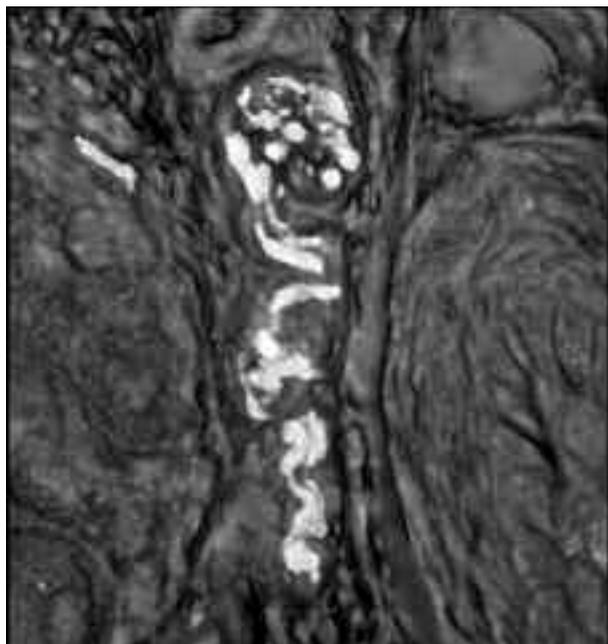


Figura 3. Sezione di cute normale inclusa in OCT, tagliata perpendicolarmente alla superficie e colorata con anticorpo anti-PGP 9,5 che mette in evidenza la componente assonale di un corpuscolo di Meissner. Ingrandimento 800X.

rigenerate in prossimità della giunzione dermo-epidermica e, in alcuni casi, si osservano quadri indicativi di corpuscoli di Meissner localizzati lungo l'asse delle papille dermiche, all'interno dei quali si osserva la presenza di fibre nervose rigenerate (marcate con il PGP 9,5).

Al contrario, nel caso di reinnervazione dilazionata a 2 e 4 mesi dall'intervento di denervazione (gruppi B2 e B4) le fibre rigenerate sono localizzate per lo più nel derma profondo, mentre la porzione superficiale del derma ed in particolare le papille sono prive di marcatura (Fig. 5). Nessun corpuscolo di Meissner appare reinnervato. Non è stato invece possibile evidenziare differenze significative tra il gruppo B2 ed il gruppo B4.

DISCUSSIONE

I dati della letteratura concernenti lo studio sperimentale dell'innervazione sensitiva cutanea sono relativamente limitati e pubblicati per lo più intor-

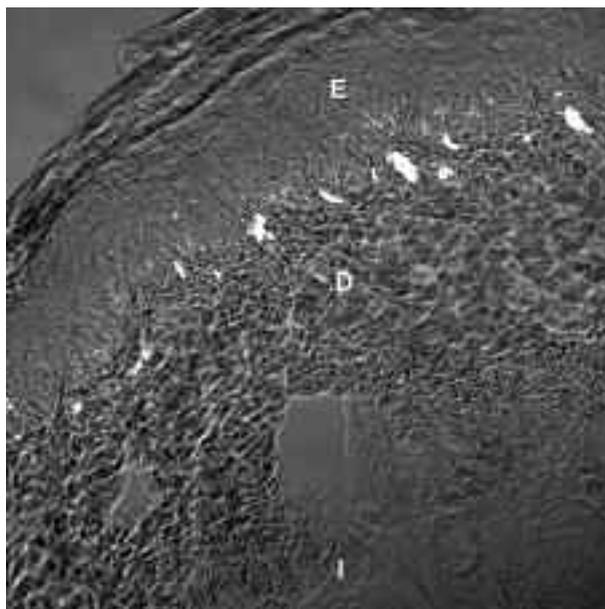


Figura 4. Sezione di cute reinnervata mediante innesto dopo 1 mese dalla denervazione, inclusa in OCT, tagliata perpendicolarmente alla superficie e colorata con anticorpo anti-PGP 9,5. Si nota la presenza di marcatura nello strato papillare del derma. E = epidermide, D = derma, I = ipoderma. Ingrandimento 300X.

no agli anni '70-'80 (5, 6, 10, 13, 16, 18, 19). In considerazione della grande evoluzione nelle tecniche di indagine morfologica avvenuta negli ultimi anni, in particolare la microscopia laser confocale (20, 21), uno degli obiettivi di questo studio era mettere a confronto differenti tecniche per lo studio dell'innervazione sensitiva cutanea al fine di identificare la metodica di indagine migliore.

Per quanto riguarda il mezzo di inclusione, i risultati di questo studio hanno evidenziato che la paraffina ha una resa migliore con le colorazioni istologiche classiche (ematossilina ed eosina e Papanicolau), mentre per quanto riguarda l'analisi immunocitochimica abbiamo verificato che la qualità delle immagini è migliore nei campioni inclusi in OCT, in particolare per la presenza di una minore autofluorescenza di fondo.

Passando alle metodiche immunocitochimiche per lo studio delle fibre nervose che innervano la cute, in letteratura vengono utilizzati diversi immunomarker rivolti sia verso la componente assonale sia verso quella gliale.

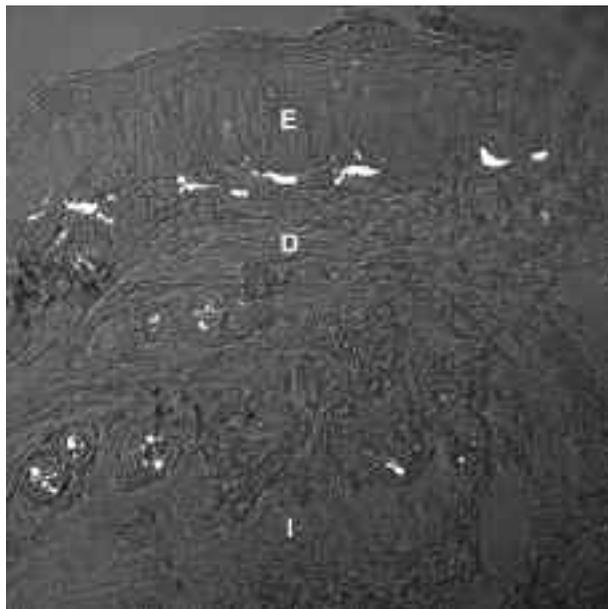


Figura 5. Sezione di cute reinnervata mediante innesto dopo 4 mesi dalla denervazione, inclusa in OCT, tagliata perpendicolarmente alla superficie e colorata con anticorpo anti-PGP 9,5. Si nota la assenza di marcatura nello strato papillare del derma. E = epidermide, D = derma, I = ipoderma. Ingrandimento 300X.

Tra i primi, il più utilizzato è sicuramente l'anticorpo anti-neurofilamenti (22, 23). I risultati da noi ottenuti, in accordo con quanto osservato da Ramieri et al. (24), hanno dimostrato che tale anticorpo non è particolarmente adatto per lo studio dell'innervazione sensitiva della cute in quanto non marca le fibre di piccolo calibro.

La PGP 9.5 (idrolasi carbossi-terminale dell'ubiquitina) (25) è un marker assonale utilizzato anche come marker di alcune cellule nervose e endocrine. Gli anticorpi diretti contro questo antigene sono anche molto utilizzati per visualizzare le fibre nervose della cute (24, 26-28) ed i risultati da noi ottenuti hanno confermato la validità di questo marker per questa finalità. La PGP 9,5 sembra essere superiore all'NSE (*Neuron Specific Enolase*), un altro marker delle fibre nervose, poiché è reperibile anche negli stadi precoci della reinnervazione²⁹.

Una seconda categoria di marker delle fibre nervose sono gli anticorpi diretti contro le cellule di Schwann, in particolare GFAP (*Glial Fibrillar Acid Protein*) e S-100. I marker gliali hanno il vantaggio

di essere evidenziabili anche nella cute denervata. L'S-100 inoltre è anche utile per marcare quegli elementi dei corpuscoli sensitivi che sono di derivazione gliale come ad es. le cellule lamellari dei corpuscoli di Meissner. Anche le cellule di Merkel e di Langherans sono marcate da questo anticorpo, mentre la PGP 9.5 non è efficace nell'evidenziare questi elementi cellulari (24). La GFAP è un marker gliale che non era finora mai stata utilizzato per evidenziare le fibre nervose nella cute. I risultati di questo studio hanno dimostrato che tale marker non dà buoni risultati e quindi l'S-100 è da considerarsi la prima scelta per questo tipo di indagini.

Le nostre osservazioni hanno dimostrato inoltre che i marker gliali, pur non riconoscendo specificamente le fibre nervose, possono essere utili in condizioni di denervazione per evidenziare le strutture che, in assenza di fibra nervosa, non sarebbero identificabili con marker assonali. In particolare, nei ratti reinnervati dopo due mesi di denervazione, abbiamo osservato cellule di Schwann disposte a formare i cordoni di Büngner nelle papille e cellule raggruppate in modo da far pensare alle cellule lamellari dei corpuscoli di Meissner, pur in assenza di assoni marcati dalla PGP 9,5.

Dal punto di vista delle variazioni correlate al tempo trascorso dopo la denervazione, l'analisi semi-quantitativa ha evidenziato come nella cute degli animali operati immediatamente (gruppo B0) le fibre siano giunte in periferia e abbiano reinnervato i loro bersagli. Confrontando il gruppo B0 con il gruppo B1 non abbiamo notato una diminuzione evidente delle fibre rigenerate nel gruppo che era rimasto denervato per un mese. Tale dato è in accordo con Dellon (14) che afferma che i recettori capsulati possono essere agevolmente reinnervati nei primi mesi successivi alla lesione e che la qualità della reinnervazione diminuisce solo superando il quarto mese di denervazione.

Dopo due e quattro mesi di denervazione (gruppi B2 e B4) invece, abbiamo osservato che poche fibre innervano le papille e non si sono osservati corpuscoli di Meissner reinnervati. Poiché il tempo post-operatorio è uguale in tutti i gruppi, questa differenza pare essere direttamente correlata al tempo di denervazione che in questi gruppi è stato

più lungo. Le fibre cutanee libere sono presenti ed in quantità invariata rispetto agli altri casi, ma sono reperibili solo nel derma profondo.

Poiché studi precedenti hanno riportato che i corpuscoli di Meissner vanno incontro ad atrofia solo dopo quattro mesi di denervazione (14), sembra possibile escludere la presenza di una atrofia del corpuscolo ed è plausibile che le differenze da noi osservate nell'innervazione cutanea non siano imputabili alla scarsa recettività del corpuscolo sensitivo, ma ad un ritardo nella crescita degli assoni. In tale ottica, sono stati avviati studi per valutare le modificazioni correlate al tempo di denervazione a livello del nervo distale rispetto alla lesione.

Inoltre, sebbene la maggior parte degli autori siano concordi sulla possibilità che gli assoni rigeneranti reinnervino i corpuscoli denervati, vi è un forte disaccordo sulla finestra temporale al di fuori della quale il recettore non può più accogliere la fibra rigenerante e pertanto ulteriori studi su tempi di denervazione più lunghi sono necessari, in particolare utilizzando metodiche di indagine ultrastrutturale.

Un altro interessante punto di discussione riguarda il modello sperimentale da noi utilizzato per lo studio della reinnervazione sensitiva della cute. Tutti gli studi precedenti hanno infatti utilizzato il modello sperimentale dell'arto inferiore (nervo sciatico), modello che tuttavia non appare adatto a tale tipo di indagine a causa della frequente presenza di ulcerazioni, automutilazioni e distrofie cutanee (5-6). Nell'arto superiore, invece, noi non abbiamo riscontrato ulcerazioni, automutilazioni, contratture articolari e distrofie cutanee. Possiamo pertanto concludere che l'utilizzo dell'arto superiore sia da considerarsi la prima scelta per lo studio dell'innervazione cutanea anche in ragione del mantenimento del benessere dell'animale (30, 31).

In conclusione, questo studio ha permesso di porre in evidenza il destino delle fibre nervose in rapporto al tempo di denervazione, indicando un limite entro cui la reinnervazione cutanea è ottimale, dal punto di vista morfologico, se comparata ad una riparazione immediata nel modello sperimentale del ratto (1-2 mesi). Dopo questo lasso di tempo si determinino delle modificazioni morfostrut-

turali nella reinnervazione che potrebbero essere la causa dei non sempre brillanti risultati.

Queste conclusioni possono avere anche importanti risvolti clinici suggerendo l'esistenza di un tempo limite entro cui la riparazione di un nervo lesionato debba essere indicata.

D'altro canto tempi di denervazione ancora più lunghi e l'ausilio di test funzionali potrebbero meglio approfondire la modalità di reinnervazione anche dopo lunghissimi periodi di denervazione. Questo indicherebbe forse ricostruzioni molto tardive al fine di recuperare almeno funzione sensitiva.

Se da un lato le tecniche microchirurgiche di riparazione nervosa hanno fatto grandi passi negli ultimi anni, d'altro lato la comprensione dei meccanismi biologici alla base della rigenerazione nervosa può fornire quelle conoscenze aggiuntive che possono portare in futuro a risultati clinici sempre più soddisfacenti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Società Italiana di Chirurgia della Mano e la famiglia Rossoni per il premio conferito a questo lavoro nell'ambito del 43° Congresso della SICM (Perugia 2005) come miglior contributo scientifico nella sezione giovani.

Si ringraziano inoltre Josette Legagneux, Jean Luc Vignes del Laboratoire de Microchirurgie dell'Ecole de Chirurgie di Parigi per l'aiuto e la disponibilità fornita nel corso di questo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Carlson BM, Borisov AB, Dedkov E, et al. Effects of long-term denervation on skeletal muscle in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57B: 366-74.
2. Halata Z. The mechanoreceptors of the mammalian skin ultrastructure and morphological classification. *Adv Anat Embr Cell Biol* 1975; 50: 13-77.
3. Halata Z, Munger BL. Sensory nerve endings in rhesus monkey sinus hairs. *J Comp Neurol* 1980; 192: 645-43.
4. Brown AG, Iggo A. The structure and function of cutaneous "touch corpuscles" after nerve crush. *J Physiol* 1963; 165: 28.
5. Ide C. Degeneration of mouse digital corpuscles. *Am J Anat* 1982; 163: 59.

6. Ide C. Regeneration of mouse digital corpuscles. *Am J Anat* 1982; 163: 73-85.
7. Boeke J. On the regeneration of sensitive end corpuscles after section of the nerve. *K Acad van Wetenschappen (Amsterdam)* 1922; 25: 319.
8. Boeke J, Dijkstra C. De- and regeneration of sensible end corpuscle in the duck's bill (Corpuscle of Gandry and Herbst) after the cutting of the nerve, the removing of the entire skin or transplantation of the skin in another region. *K Acad van Wetenschappen (Amsterdam)* 1932; 35: 1114.
9. Zelena J. Development, degeneration and regeneration of receptor organs. *Prog Brain Res* 1964; 13: 175-213.
10. Zelena J. The effect of long-term denervation on the ultrastructure of Pacinian corpuscles in the cat. *Cell Tissue Res* 1984; 238: 387-94.
11. Chouchkov HN. Ultrastructure of Pacinian corpuscles in men and cats. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1971; 83: 33-46.
12. Korthals JK, Wisniewski HM, Ghetti B, Cook RD. The fate of the axon and its terminal in the Pacinian corpuscle following sciatic nerve section. *J Neurocytol* 1974; 3: 385-403.
13. Ide C. Basal laminae and Meissner corpuscle regeneration. *Brain Res* 1986; 384: 311-22.
14. Dellon AL. Reinnervation of denervated Meissner corpuscles: a sequential histologic study in the monkey following fascicular nerve repair. *J Hand Surg* 1976; 1: 98-109.
15. Kopp DM, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Glial growth factor rescues Schwann cells of mechanoreceptors from denervation-induced apoptosis. *J Neurosci* 1997; 17: 6697-706.
16. Zelena J, Jirmanova I, Nitatori T, Ide C. Effacement and regeneration of tactile lamellar corpuscles of rat after post-natal nerve crush. *Neuroscience* 1990; 39: 513-22.
17. Greene EC. *Anatomy of the rat*. Hafner Publishing Company. New York and London, 1963.
18. Zelena J. Survival of Pacinian corpuscles after denervation in adult rats. *Cell Tissue Res* 1982; 224: 673-83.
19. Ide C. Role of extracellular matrix in the regeneration of a pacinian corpuscle. *Brain Res* 1987; 413: 155-69.
20. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC. Innervation and vasculature of human sweat glands: an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *J Neurosci* 1994; 14: 6825-33.
21. Castano P, Rumio C, Morini M, Miani A Jr, Castano S. M. Three-dimensional reconstruction of the Meissner corpuscle of man, after silverimpregnation and immunofluorescence with PGP 9.5 antibodies using confocal scanning laser microscopy. *J Anat* 1995; 186: 261. Erratum in: *J Anat* 1995; 187: 507.
22. Lawson SN, Harper AA, Harper EI, Garson JA, Anderton BH. A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *J Comp Neurol* 1984; 228: 263-72.
23. Varejão ASP, Cabrita AM, Meek MF, Fornaro M, Geuna S. Nerve regeneration inside fresh skeletal muscle-enriched synthetic tubes: a laser confocal microscope study in the rat sciatic nerve model. *Ital J Anat Embryol* 2003; 108: 77.
24. Ramieri G, Stella M, Calcagni M, Teich-Alasia S, Cellino G, Panzica GC. Morphology of corpuscular receptors in hairy and nonhairy human skin as visualized by an antiserum to protein gene product 9.5 compared to anti-neuron-specific enolase and anti-S-100 protein. *Acta Anat (Basel)* 1992; 144: 343-7.
25. Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989; 246: 670-3.
26. Ramieri G, Stella M, Calcagni M, Cellino G, Panzica G. C. An immunohistochemical study on cutaneous sensory receptors after chronic median nerve compression in man. *Acta Anat (Basel)* 1995; 152: 224-9.
27. Calcagni M, Stella M, Ramieri G, Cellino G, Panzica G. C. Fibre nervose e recettori sensitivi nella cute umana evidenziati con anticorpo anti-protein-gene-product 9.5. *Riv Ital Chir Plast* 1993; 25: 215.
28. Verze L, Viglietti-Panzica C, Plumari L, et al. Cutaneous innervation in hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. *Neurology* 2000; 55: 126-8.
29. Stella M, Ramieri G, Anselmetti GC. Dimostrazione di fibre nervose rigeneranti nella cute cicatriziale e trapiantata mediante un anticorpo contro la PGP 9.5. *Riv Ital Chir Plast* 1990; 22: 125.
30. Papalia I, Tos P, Stagno d'Alcontres F, Battiston B, Geuna S. On the use of the grasping test in the rat median nerve model: a re-appraisal of its efficacy for quantitative assessment of motor function recovery. *J Neurosci Methods* 2003; 127: 43-7.
31. Tos P, Boux E, Geuna S, Varejão ASP, Battiston B. Metodi di valutazione del recupero della funzione nervosa periferica in chirurgia sperimentale. *Riv Chir Mano* 2003; 40: 109-18.