

# EFFETTO DELLA DENERVAZIONE PROLUNGATA SULLA REINNERVAZIONE CUTANEA IN SEGUITO A RICOSTRUZIONE NERVOSA MICROCHIRURGICA: STUDIO SPERIMENTALE

A. SCEVOLA<sup>1</sup>, S. RAIMONDO<sup>2</sup>, S. GEUNA<sup>2</sup>, I. PAPALIA<sup>3</sup>, P. TOS<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UOC Chirurgia Plastica Generale - Ospedale C.T.O. di Torino

<sup>2</sup>Dipartimento Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino

<sup>3</sup>Dipartimento di Discipline Chirurgiche Generali e Speciali, Università di Messina

<sup>4</sup>UOC Microchirurgia - Ospedale C.T.O. di Torino

---

*Effect of long-term denervation on skin reinnervation after microsurgical nerve reconstruction: an experimental study*

## SUMMARY

**Introduction:** *In a previous study, we have shown that skin reinnervation after median nerve microsurgical reconstruction is worse when a lapse of time of 2–4 months passes between the lesion and the reconstruction. Aim of the study:* *The aim of this study is to further investigate, in the same experimental model, if the deficit in reinnervation due to a delayed nerve repair increases when a 8-month lapse of time passes between the lesion and the reconstruction. Materials and methods:* *In adult Wistar female rats, the left median nerve was resected and a 1-cm long segment was removed. The nerve was then repaired by an autologous graft performed 8 months after the lesion. Two months after the nerve repair, the animals were sacrificed. The skin of the II, III and IV finger from each rat was analyzed by means of immunocytochemistry with a-PGP 9.5 antibodies. In addition, axonal regeneration along the distal stump of the repaired nerve was analyzed by means of anti-neurofilament-200kD antibody. Results:* *Unlike what was observed for a shorter delay between lesion and reconstruction, immunocytochemical analysis showed the presence of a very limited amount of regenerated cutaneous nerve fibers (immunopositive for a-PGP 9.5), as well as regenerated nerve fibers (immunopositive for a-neurofilament-200kD) in the distal median nerve stumps. Conclusions:* *The results of the present study confirm that the length of the denervation period is inversely proportional to the quality of the skin reinnervation and suggest that to obtain a good recovery of the sensory function, the repair of the nerve must be performed as soon as possible. Riv Chir Mano 2007; 2: 125-130*

## KEY WORDS

Nerve regeneration, long-term denervation, PGP 9.5

---

## RIASSUNTO

**Introduzione:** *In un precedente studio sperimentale abbiamo osservato che la qualità della reinnervazione cutanea in seguito a ricostruzione microchirurgica del nervo mediano di ratto peggiora significativamente quando tra la denervazione e la successiva ricostruzione trascorre un tempo di 2–4 mesi. Scopo dello studio:* *Obiettivo del presente studio è stato quello di valutare, nel medesimo modello sperimentale, se il difetto di innervazione dovuto al ritardo nella riparazione microchirurgica aumenta ulteriormente prolungando (fino ad 8 mesi) il lasso di tempo tra lesione e ricostruzione nervosa. Materiali e metodi:* *In ratti Wistar femmine adulte, il nervo mediano di sinistra è stato resecato asportando un segmento di 1 cm di lunghezza. Il nervo è stato quindi riparato mediante innesto autologo a*

*distanza di 8 mesi dal primo intervento. Il sacrificio degli animali è stato eseguito due mesi dopo la ricostruzione nervosa. Di ogni ratto è stata analizzata la cute del II, III e IV dito mediante tecnica immunocitochimica con anticorpo anti-PGP 9.5. Si è inoltre analizzata la rigenerazione nervosa nei nervi distali rispetto alla lesione mediante anticorpo anti-neurofilamento-200kD. Risultati: A differenza di quanto si osserva per periodi di denervazione più brevi, in seguito alla riparazione nervosa dopo 8 mesi di denervazione, l'analisi immunocitochimica ha evidenziato la presenza di una quantità molto esigua di fibre nervose cutanee positive per il PGP 9.5, nonché di fibre nervose rigenerate nel nervo mediano (positive per il neurofilamento-200kD). Conclusioni: I risultati di questo studio confermano che il protrarsi del periodo di denervazione è inversamente proporzionale alla qualità della reinnervazione della cute denervata e suggeriscono quindi che, per ottenere un buon recupero della funzione sensitiva, la riparazione microchirurgica di un nervo debba essere fatta appena possibile.*

#### PAROLE CHIAVE

Rigenerazione nervosa, denervazione prolungata, PGP 9.5

#### INTRODUZIONE

Per lo studio sperimentale sulle tecniche di chirurgia ricostruttiva dei nervi periferici è necessario tenere in considerazione l'efficacia dell'intervento ricostruttivo non solo sul recupero della funzione motoria, ma anche sul recupero della sensibilità cutanea. Tale tipo di indagine, nei modelli sperimentali animali, viene principalmente condotto mediante metodiche morfologiche, in particolare l'immunocitochimica e la microscopia confocale (1-5). Tuttavia, le informazioni in merito alle modificazioni cui vanno incontro nel tempo le fibre sensitive cutanee dopo denervazione e successiva ricostruzione nervosa sono ancora alquanto lacunose in letteratura. In particolare, mancano osservazioni sistematiche che descrivano se, ed in che modo, il protrarsi del tempo di denervazione (ovvero il tempo passato tra la lesione nervosa e la successiva ricostruzione) influisca sul successivo processo di reinnervazione sensitiva cutanea e pertanto la determinazione del tempo limite entro il quale i corpuscoli sensitivi possono essere validamente reinnervati (6-8).

In uno studio precedente nel modello sperimentale rappresentato dal nervo mediano di ratto (9), abbiamo dimostrato, mediante analisi immunocitochimica con anticorpo anti-PGP 9.5 e microscopia confocale, che le fibre nervose cutanee scompaiono molto precocemente (già a 30 giorni) dopo una lesione nervosa completa. Nel ratto, se la ricostruzio-

ne nervosa viene effettuata immediatamente dopo la lesione, le fibre nervose innervano nuovamente la cute denervata e raggiungo lo strato papillare del derma nell'arco di 2 mesi. Mentre nel caso di riparazione dilazionata di 1 mese non si sono osservati cambiamenti significativi, se si ritarda la ricostruzione nervosa di 2 e 4 mesi si osserva un difetto parziale di innervazione (9). I risultati di questo recente studio, che indicano come per un buon recupero della funzione sensitiva si debba eseguire la riparazione del nervo non oltre un certo arco temporale, hanno posto l'ulteriore domanda se il dilazionamento ancora maggiore della riparazione chirurgica del nervo possa compromettere ulteriormente il processo di reinnervazione cutanea. Per rispondere a questa domanda, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare la rigenerazione delle fibre nervose cutanee dopo un tempo prolungato di denervazione (8 mesi) nel medesimo modello sperimentale murino già utilizzato nel precedente studio.

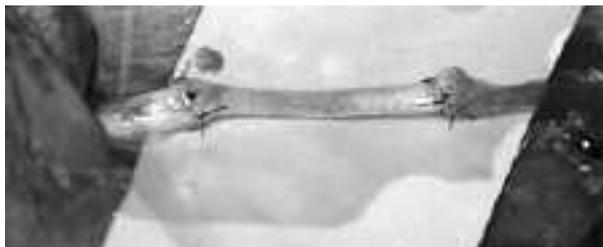
#### MATERIALI E METODI

Gli interventi di microchirurgia di questo studio sperimentale sono stati condotti presso il Laboratorio de Microchirurgie dell'École de Chirurgie di Parigi. In ratti Wistar adulti, femmine, del peso di circa 200-225 g, si è proceduto, in anestesia profonda effettuata con 0,6 ml di una miscela rea-

lizzata con 10 ml di ketamina (Penpaharma, 50 mg/ml) ed 1,5 ml di carbamazepina (Largactil, 5 mg/ml), alla interruzione del nervo mediano di sinistra mediante asportazione di un segmento di 10 mm di nervo a livello della diafisi omerale. Previa depilazione dell'arto e preparazione del campo, si procede con un'incisione longitudinale 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 operatorio, si esegue un'attenta dissezione al fine di risparmiare l'arteria brachiale e la vena basilica. Si sezionano poi bilateralmente il nervo mediano ed il nervo ulnare, rimuovendo un segmento di 10 mm e fissando il capo prossimale di ciascun nervo al di sotto del muscolo grande pettorale per prevenire una eventuale reinnervazione spontanea.

A distanza di 8 mesi, è stata eseguita la riparazione del nervo lesionato mediante innesto di un segmento di 10 mm di nervo mediano prelevato dall'arto controlaterale (Fig. 1). Il nervo, prima di essere riparato, è stato esaminato per verificare che non vi fosse stata una reinnervazione spontanea tra i due monconi. Dopo recentazione dei due monconi nervosi, il gap residuo è stato colmato con un innesto dal nervo mediano controlaterale girato di 180° e suturato con 3-4 punti in Nylon 10/0 per ogni lato.

Gli animali sono infine stati prelevati a distanza di 2 mesi dopo l'intervento di ricostruzione nervosa e da ogni animale è stata prelevata la cute palmare del II, III e IV e il tratto di nervo mediano distale rispetto al punto di lesione. Inoltre, sono stati anche prelevati campioni di nervo mediano ad una distanza di 1cm distalmente rispetto al punto dove è stata eseguita la riparazione microchirurgica. I campioni 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%)



**Figura 1.** *L'intervento di ricostruzione microchirurgica (mediante innesto di nervo autologo) del nervo mediano di ratto resecato 8 mesi prima.*

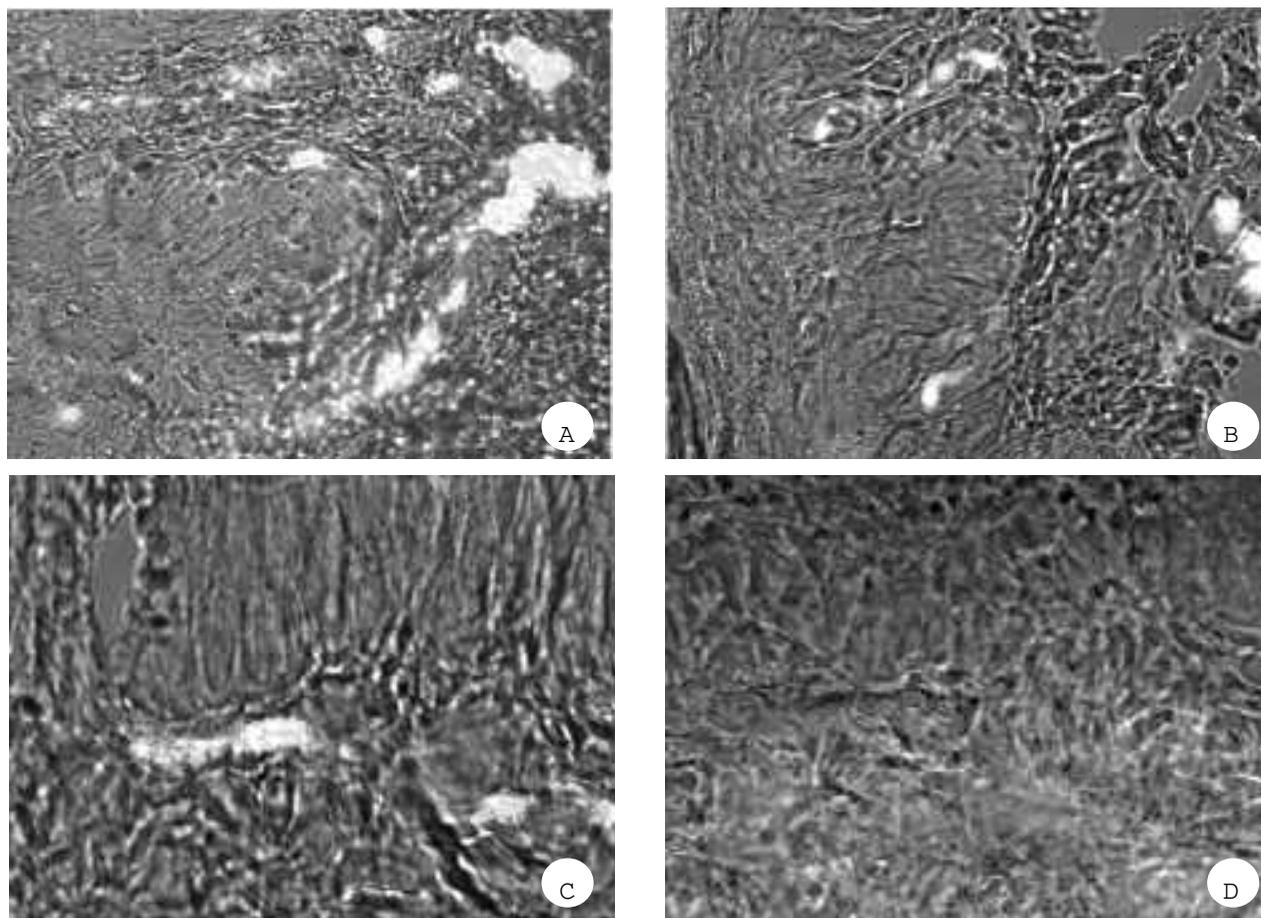
in PBS 0.1 M, e quindi con un passaggio in una soluzione 1:1 di OCT e PBS al 30% di saccarosio.

Sono state quindi allestite tre serie di sezioni dello spessore di 10 µm che sono state colorate o mediante ematossilina ed eosina o mediante analisi immunostochimica dopo incubazione il marker assonali a-PGP 9.5 (policlonale in rabbit, 1:4000 in PBS), nel caso dei campioni di cute, ed a-neurofilamento-200kD (monoclonale in mouse, 1:200 in PBS). Sono stati quindi eseguiti due lavaggi di 10 minuti in PBS e l'incubazione di un'ora con l'anticorpo secondario fluorescente CY3-conjugated (anti-rabbit, 1:400). Infine, dopo un lavaggio in PBS, i vetrini sono stati montati mediante il *fluorescent mounting medium* ed analizzati al microscopio ottico e al microscopio laser confocale.

## RISULTATI

La figura 2 mostra i risultati dell'analisi immunostochimica delle fibre nervose rigenerate nella cute di ratti in cui la riparazione microchirurgica del nervo è stata eseguita a tempi differenti dopo la lesione nervosa. Mentre nei ratti nei quali la riparazione del nervo è stata eseguita dopo 1 (Fig. 2A), 2 (Fig. 2B) e 4 mesi (Fig. 2C) si possono osservare fibre nervose rigenerate (marcate con il PGP 9.5) nel derma, nel caso di reinnervazione dilazionata di 8 mesi dall'intervento di denervazione (Fig. 2D) non è possibile identificare fibre rigenerate cutanee, se non eccezionalmente nel derma profondo.

La figura 3 mostra i risultati dell'analisi immunostochimica delle fibre nervose rigenerate (mar-



**Figura 2.** Microfotografie digitali di preparati di cute innervata colorata con anticorpo anti-PGP 9.5 che mette in evidenza gli assoni. A. L'intervento di reinervazione è stato condotto a distanza di 1 (A), 2 (B), 4 (C) e 8 (D) mesi dopo la lesione. Mentre in A, B e C sono evidenziabili fibre nervose rigenerate nel derma, queste sono assenti in D. Ingrandimenti: A = 600X, B, D = 400X, C = 800X.

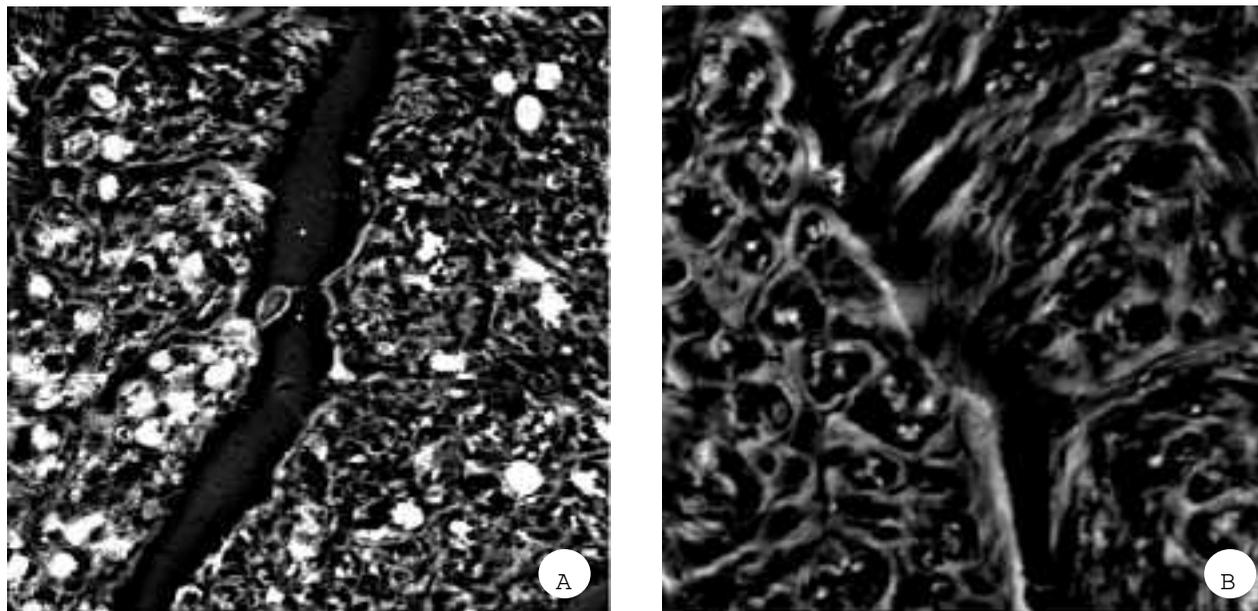
cate con l'anticorpo anti-neurofilamento-200kD) lungo il nervo distale rispetto al punto dove è stata eseguita la riparazione microchirurgica. Mentre nei casi nei quali la riparazione nervosa è stata eseguita entro i primi mesi dopo la lesione si possono osservare numerose fibre nervose marcate (Fig. 3A), nei casi in cui la riparazione è stata ritardata di 8 mesi la presenza di assoni rigenerati è minima (Fig. 3B).

## DISCUSSIONE

I recenti progressi nelle metodiche di indagine dell'innervazione cutanea, in particolare la micro-

scopia laser confocale (4, 10), hanno permesso di aumentare le nostre conoscenze sul recupero dell'innervazione sensitiva cutanea in seguito a riparazione microchirurgica di un nervo periferico (9). Tra i vari makers assonali utilizzabili, la PGP 9.5 (idrolasi carbossi-terminale dell'ubiquitina) (11) è quello più efficace per visualizzare le fibre nervose della cute (3, 12-14). Inoltre tale marker, a differenza di altri quali l'anti-NSE (*Neuron Specific Enolase*) e l'anti-neurofilamento-200kD, è evidenziabile anche negli stadi precoci della reinervazione (2, 9).

Lo studio descritto in questo articolo si proponeva di analizzare la qualità della reinervazione cutanea nel caso di riparazione chirurgica di un



**Figura 3.** Microfotografie digitali di preparati di nervo mediano distale rispetto al punto dove è stata eseguita la riparazione microchirurgica a distanza di 2 (A) e 8 (B) mesi dalla lesione. I preparati sono stati colorati con l'anticorpo anti-neurofilamento-200kD (marker assonale) che evidenzia numerose fibre nervose rigenerate in A, mentre gli assoni sono quasi completamente assenti in B. Ingrandimento 800X.

nervo misto dilazionata nel tempo (8 mesi dopo la lesione). Infatti, studi recenti hanno dimostrato che mentre nella cute degli animali operati nel corso dei primi 2 mesi dopo la lesione le fibre giungono in periferia e reinnervano i loro bersagli in modo corretto, la qualità della reinnervazione cutanea diminuisce in modo significativo se si superano i quattro mesi di denervazione (9). Ci siamo pertanto chiesti quale fossero le conseguenze sull'innervazione cutanea di un tempo di denervazione ancora maggiore (8 mesi) ed i dati da noi ottenuti hanno permesso di dimostrare come, in queste condizioni sperimentali, la reinnervazione cutanea sia praticamente assente.

Tale osservazione è in accordo con quanto detto da Dellon (6), che afferma che i recettori capsulati possono essere agevolmente reinnervati solo nei primi mesi successivi alla lesione. Questo potrebbe essere imputabile o ad una scarsa recettività del corpuscolo sensitivo, dovuta alla sua degenerazione atrofica, o ad un ritardo nella crescita degli assoni all'interno del derma, dovuto alle modificazioni che si possono verificare a livello del nervo distale in

seguito a tempi prolungati di denervazione. I risultati da noi ottenuti, sebbene non ci permettano di escludere che l'atrofia dei corpuscoli sensitivi abbia un ruolo nei fenomeni da noi osservati, ci permettono tuttavia di affermare che anche l'atrofia del nervo distale gioca un ruolo fondamentale nel rallentare (o inibire) il processo di rigenerazione assonale con conseguente ritardata (o inibita) reinnervazione sensitiva della cute.

In conclusione, i risultati di questo studio ci permettono di confermare quanto già ipotizzato in precedenza (9), ovvero che il destino delle fibre nervose dipende in modo significativo dal tempo di denervazione che fa seguito ad una lesione nervosa, definendo un limite entro cui la reinnervazione cutanea è ottimale nel modello sperimentale del ratto.

Da un punto di vista dell'interesse clinico, i risultati di questo studio confermano che, per ottenere un buon recupero della funzione sensitiva, la riparazione microchirurgica di un nervo lesionato debba essere fatta nell'arco di un tempo non troppo lungo, ovvero appena le condizioni cliniche del paziente lo consentano.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano inoltre Josette Legagneux e Jean Luc Vignes del Laboratoire de Microchirurgie dell'École de Chirurgie di Parigi per l'aiuto e la disponibilità fornita nel corso di questo studio. Il presente studio è stato finanziato con fondi del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Teich-Alasia S, Zocchi M, Stella M. Structural study of the regeneration of sensory receptors in transplanted skin flaps. *Ann Chir Plast* 1982; 27: 379-83.
2. Stella M, Ramieri G, Anselmetti GC, et al. Dimostrazione di fibre nervose rigeneranti nella cute cicatriziale e trapiantata mediante un anticorpo contro la PGP 9.5. *Riv Ital Chir Plast* 1990; 22: 125-34.
3. Ramieri G, Stella M, Calcagni M, et al. 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* 1992; 144: 343-7.
4. Castano P, Rumio C, Morini M, et al. 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: 261-70.
5. Panzica GC, Paraninfo A, Ramieri G, et al. La rigenerazione sensitiva in trapianti cutanei dopo lesione da ustione. *Riv Ital Chir Plast* 1997, 29: 103-23.
6. Dellon AL. Reinnervation of denervated Meissner corpuscles: a sequential histological study in the monkey following fascicular nerve repair. *J Hand Surg* 1976; 1A: 98-109.
7. Ide C. Degeneration of mouse digital corpuscles. *Am J Anat* 1982; 163: 59-72.
8. Ide C. Regeneration of mouse digital corpuscles. *Am J Anat* 1982; 163: 73-85.
9. Scévola A, Gilardi R, Raimondo S, et al. Studio morfologico sulla degenerazione e rigenerazione delle fibre nervose cutanee in relazione al tempo di denervazione. *Riv Chir Mano* 2005; 42: 96-104.
10. 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.
11. Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, et al. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989; 246: 670-3.
12. Ramieri G, Stella M, Calcagni M, et al. An immunohistochemical study on cutaneous sensory receptors after chronic median nerve compression in man. *Acta Anat* 1995; 152: 224-9.
13. Calcagni M, Stella M, Ramieri G, et al. Fibre nervose e recettori sensitivi nella cute umana evidenziati con anticorpo anti-protein-gene-product 9.5. *Riv Ital Chir Plast* 1993; 25: 215-25.
14. Verze L, Viglietti-Panzica C, Plumari L, et al. Cutaneous innervation in hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. *Neurology* 2000; 55: 126-8.