



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

**“Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi
protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo
periferico “**

Docente Guida
Prof.ssa Maria Lucia Manunta

Il Coordinatore
Prof. Salvatore Naitana

Tesi di dottorato della
Dott.ssa Maria Letizia Guida

ANNO ACCADEMICO 2015 - 2016

INDICE	1
ABSTRACT	2
CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE	3
1.1 LESIONI NERVOSE	4
1.1.1 Epidemiologia e meccanismi traumatici delle lesioni nervose periferiche	4
1.1.2 Gradazione delle lesioni del nervo	7
1.1.3 Elettromiografia	10
1.2 ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA	16
1.2.1 Struttura microscopica dei nervi periferici	16
1.2.2 Fisiopatologia del sistema nervoso periferico	18
1.3 STATO DELL'ARTE	23
1.3.1 Opzioni terapeutiche	23
1.3.2 Tubulizzazione	27
1.3.2.1 Cenni storici sulle guide nervose	28
1.3.2.2 Progettazione del tubo nervoso ideale	29
1.3.2.3 Materiali utilizzati nelle guide nervose	31
1.3.2.4 Modificazioni della struttura interna del condotto	43
CAPITOLO 2	
2.1 ANATOMIA MACROSCOPICA DEL PLESSO BRACHIALE	66
2.2 LESIONI DEL PLESSO BRACHIALE	85
CAPITOLO 3	
NEUROBOX	88
CAPITOLO 4	
4.1 SCOPO DEL LAVORO	91
4.2 STUDIO PILOTA	92
4.3 STUDIO SPERIMENTALE	96
4.3.1 Materiali e metodi	96
4.3.2 Risultati	101
CAPITOLO 5	
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.	112
BIBLIOGRAFIA	121

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

ABSTRACT

Background

The results of current treatments for multiple peripheral nerve injuries are not fully satisfactory. The lack of an adequate animal model is one of the main problems in brachial plexus research. A new concept of nerve-guide, called "NeuroBox" (NBX), double-halved, not-degradable and rigid, and does not require the use of any stitch to be sutured to the nerve stump have been recently proposed.

Our hypothesis is to treat brachial plexus lesions as they are occurring in a single big plexiform peripheral nerve and NBX could provide protection and guidance to nerves stump.

Aim

To verify the sheep as animal model in brachial plexus regeneration and test NBX for treating multiple nerve lesions.

Material and Methods.

Pilot study: n°2 Sarda sheep. Operative technique, device dimensions, experimental lesions comparable in Humans were evaluated.

Experimental study: n°8 Sarda sheep received the section of the thoracic nerve roots, NBX was positioned. Animals were randomly divided in two groups and were clinically evaluated for 10 and 32 weeks respectively. Histological and immune-histochemistry were performed.

Discussion and Results.

N°4 animals completed the study. No scar tissue between the distal and proximal nerve stumps was observed in histological evaluation. Nerve regeneration was observed with tiny vessels dispersed into the regenerated. Ovine can be used as animal model. NBX can provide a suitable regeneration chamber in nerve lesions.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

La lesione del nervo periferico è un problema clinico comune globale che colpisce in modo significativo la qualità della vita dei pazienti e provoca un enorme onere socioeconomico (Gu, 2014).

Aegineta (626-696 d.C.) per primo descrisse la rigenerazione del nervo. Nel 1850 Waller ha descritto la perdita, in seguito a lesione, del segmento assonale distale dei nervi glossofaringeo e ipoglosso nella rana. Il processo della degenerazione Walleriana rimane ancora oggi uno dei maggiori ostacoli per una rapida e completa rigenerazione dei nervi nei mammiferi. Nel 1873 Huentner, per primo, ha descritto una tecnica di riparazione epineurale del nervo che viene usata tuttora. Nel 1892 Cajal ha scoperto che i fattori neurotrofici guidano preferenzialmente gli assoni in rigenerazione distalmente fino all'organo target. Nel 1945 Sunderland ha descritto i principi della riparazione chirurgica del nervo e Kurze e Smith li hanno messi in pratica nel 1964 in seguito allo sviluppo del microscopio operatorio. Negli ultimi 50 anni sono state apportate solo delle minime rifiniture a questa tecnica chirurgica e la riparazione epineurale rimane la tecnica di ricostruzione gold standard (Grinsell, 2014)

Anche se Paulus Aegineta (626-696 d.C.) è stato il primo medico che postulava un possibile recupero per nervi lesionati, prima del 1700 i chirurghi avevano tendenzialmente paura a manipolare i nervi. L'introduzione di tecniche di microchirurgia dei nervi periferici e l'istituzione del principio della chirurgia libera da tensione nella riparazione che ne è seguita ha ispirato chirurghi come Narakas, Millesi, Allieu, Brunelli, Terzis, Doi, Gu, ed altri a suggerire diversi nuovi approcci per la ricostruzione dei nervi. Con l'ulteriore accumulo di conoscenze e di una crescente comprensione dell'anatomia del nervo, della funzione e della fisiologia, ha fatto seguito una più precisa comprensione del processo di guarigione del nervo che ha avviato la creazione di strategie razionali per la riparazione dei nervi, portandolo da una speculazione selvaggia ad una realtà più prevedibile. Sono tanti i fattori che influenzano il successo della riparazione dei nervi e della ricostruzione.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

L'età del paziente, i tempi di riparazione dei nervi, il grado della lesione, l'estensione della zona lesionata, l'abilità tecnica del chirurgo e il metodo di riparazione sono tutti fattori che contribuiscono all'outcome funzionale in seguito a lesione. (Konofaos, 2013)

1.1 LESIONI NERVOSE

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA E MECCANISMI TRAUMATICI DELLE LESIONI NERVOSE PERIFERICHE

I traumi dei nervi periferici rappresentano sicuramente un argomento di grande interesse per la loro elevata frequenza e per l'impatto altamente negativo che hanno sulla qualità della vita, considerando inoltre che la popolazione giovane adulta è quella maggiormente colpita da questo tipo di lesioni. Oggi le cause più importanti sono rappresentate da incidenti stradali, sportivi e sul lavoro; le ferite riportate nei conflitti militari, anche se meno importanti numericamente rispetto al secolo scorso, comportano spesso grosse perdite di tessuti molli e quindi le lesioni nervose ad esse associate sono per lo più devastanti e difficili da trattare; infine, anche le lesioni iatrogene sono abbastanza frequenti.

Secondo uno studio epidemiologico durato 16 anni (1989-2006) su 456 pazienti l'età media dei pazienti che subiscono lesioni traumatiche nervose corrisponde a circa 32 anni con prevalenza nel sesso maschile (74%). Nell'83% dei casi è interessato l'arto superiore e la lesione del nervo ulnare risulta essere quella più frequente. (Kouyoumdjian, 2006).

Un altro studio retrospettivo su 938 pazienti condotto da Eser et al. ha in gran parte confermato questi dati e rilevando che la principale causa di traumi nervosi è causata dagli incidenti stradali soprattutto su motoveicolo, in cui meccanismi di stiramento del nervo giocano un importante ruolo (Eser, 2009).

Le lesioni nervose riportate durante attività sportiva rappresentano circa il 5,7% di tutte le lesioni e possono essere provocate sia da un unico importante trauma che da microtraumi ripetuti nel tempo (Hirasawa, 1983). In ambito militare le granate ed altri tipi di esplosivi, provocando grosse

perdite di tessuti molli, rappresentano la principale causa di gravi danni del sistema nervoso periferico, spesso associati a lesioni vascolari che peggiorano la prognosi di queste ferite (Maricević, 1997).

Da ricordare sono anche le lesioni iatrogene che, secondo uno studio su 722 casi di lesione traumatica nervosa, rappresentano il 17,4% di tutte le lesioni (Kretschmer, 2001).

I meccanismi traumatici più comuni che possono provocare una lesione nervosa comprendono ferite penetranti, contusioni, trazioni ed ischemia. In generale la trazione rappresenta il tipo più frequente di lesione nervosa. I nervi periferici hanno infatti proprietà elastiche derivanti dal collagene presente nell'endonevrio, ma quando la forza tensiva supera la capacità di allungamento del nervo, si verifica un danno delle strutture nervose. Se la forza applicata è abbastanza grande, si può ottenere una completa interruzione della continuità del tronco nervoso, come succede nelle avulsioni del plesso brachiale. Comunque più frequentemente la continuità viene mantenuta. Le lacerazioni come quelle provocate da un coltello, sono un altro tipo molto comune di lesione, arrivando a comprendere il 30 % delle gravi lesioni secondo alcuni studi. Un'altra frequente causa è rappresentata dalla compressione nervosa che associa fenomeni di deformazione meccanica a fenomeni ischemici; è stato piuttosto difficile comprendere quale di questi due ultimi meccanismi fosse il più importante, ma esperimenti degli anni Trenta sulla compressione da *tourniquet* hanno dimostrato che, almeno nelle compressioni di breve durata, è l'ischemia e non la pressione in sé a causare il blocco della conduzione. Le grosse fibre mieliniche sembrano più suscettibili all'ischemia, per questo i sintomi motori sono più marcati. Le lesioni dovute a compressione in genere provocano ben poche alterazioni istologiche e gli effetti sulla conduzione risultano reversibili a meno che l'ischemia non permanga per più di 8 ore (Burnett, 2004). Vanno infine ricordati altri meccanismi traumatici meno frequenti come shock termico, shock elettrico, vibrazioni e radiazioni (Campbell, 2008).

Il sistema nervoso periferico possiede un'abilità intrinseca nella riparazione e nella rigenerazione e le eventuali lesioni sono più frequentemente attribuibili a traumi meccanici diretti e, meno frequentemente, a resezioni chirurgiche secondarie a escissioni tumorali. La capacità di rigenerazione dipende dall'età del paziente, dal meccanismo che ha portato alla lesione e in

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

particolare dalla vicinanza della lesione al corpo cellulare del nervo (Faroni, 2014). In generale i nervi dell'arto superiore sono quelli che risultano lesionati più di frequente, rappresentando circa il 70-80% dei casi. In Europa ogni anno si stimano oltre 300.000 nuovi casi di lesione dei nervi periferici e i costi per trattamento, riabilitazione e assistenza sono molto elevati e in continuo aumento.

Una grave lesione del nervo ha un impatto indubbiamente devastante sulla qualità della vita di un paziente. I sintomi tipici sono deficit della funzionalità motoria e sensoriale che possono risultare in una paralisi totale dell'arto affetto o nello sviluppo di dolore neuropatico cronico. Le fibre nervose del nervo resecato si rigenerano spontaneamente in una misura limitata dall'ampiezza del gap creatosi, dalla formazione di neuromi e dalla formazione di tessuto cicatriziale. Molte lesioni richiedono una ricostruzione chirurgica del nervo e una meta-analisi nel 2005 ha dimostrato che in caso di riparazione dei nervi mediano e ulnare solo il 51.6% dei pazienti ha ottenuto un recupero della funzionalità motoria soddisfacente e ancora meno, il 42,6% ha ottenuto un soddisfacente recupero della funzionalità sensoriale (Ruijs, 2005). Le lesioni più recenti e quelle più distali sono quelle in cui si hanno gli esiti migliori. L'obiettivo principale della riparazione di un nervo è permettere la reinnervazione degli organi target guidando gli assoni in rigenerazione all'interno del microambiente del nervo (Grinsell, 2014).

Nei casi meno gravi i sintomi sono solo transitori e si può assistere ad un recupero graduale delle varie funzioni, poiché i neuroni, in seguito a lesione, hanno la capacità di dare inizio ad un processo di ricostruzione e di allungamento dell'assone leso fino al raggiungimento della sua lunghezza originale e alla reinnervazione dei tessuti rimasti denervati, chiaramente sempre dipendentemente da età del paziente, gravità della lesione, perdita di tessuto nervoso e fibrosi. Inoltre esiste la possibilità che i nuovi assoni crescano nella direzione sbagliata e raggiungano un tessuto diverso da quello che originalmente innervavano, creando un cosiddetto "*mismatch*" nervoso. Per cui il recupero spontaneo da un trauma nervoso varia molto in maniera individuale e molti pazienti non riescono a recuperare in maniera soddisfacente le funzioni dell'arto.

A differenza di altri tessuti, la rigenerazione del nervo periferico è lenta e solitamente incompleta. Meno della metà dei pazienti sottoposti a riparazione del nervo in seguito ad una sua lesione riacquisiscono una funzionalità sensoriale e motoria da buona a eccellente e le attuali tecniche chirurgiche sono simili a quelle descritte da Sunderland più di 60 anni fa. La nostra crescente conoscenza della fisiologia e della rigenerazione del nervo supera le nostre capacità chirurgiche di ricostruire nervi danneggiati e promuovere una efficace rigenerazione della funzionalità motoria e sensoriale. Il sistema nervoso periferico è diviso in sistema nervoso somatico e sistema nervoso autonomo. Le lesioni del nervo periferico risultano in una perdita completa o parziale della funzionalità motoria, sensoriale o delle funzioni autonome delle aree innervate dal nervo lesionato. Dopo una lesione del nervo, gli assoni vanno incontro ad un processo degenerativo seguito da un tentativo di rigenerazione. Nonostante i progressi nel campo della microchirurgia per quanto riguarda la precisione, molto raramente si raggiunge una completa ripresa funzionale in seguito alla riparazione del nervo periferico (Pabari, 2010).

1.1.2 GRADAZIONE DELLE LESIONI DEL NERVO

La prima classificazione delle lesioni dei nervi periferici è stata fatta da Seddon nel 1947, ed egli descriveva tre gradi di lesione.

- 1) **La neuroprassia** è un danno segmentale a carico della mielina (l'assone rimane intatto), causato solitamente da una compressione. Determina un temporaneo blocco focale della conduzione che si risolve completamente in circa 12 settimane in seguito a ripristino della mielinizzazione.
- 2) **L'assonotmesi** deriva da un trauma da impatto ed è una lesione assonale in cui la continuità del tessuto connettivo e del nervo rimane intatta. Si ha una degenerazione Walleriana cui segue una lenta rigenerazione assonale con una velocità di crescita di 1 mm al giorno. Spesso la guarigione non è completa: ciò dipende dall'ampiezza del tratto compreso tra la lesione e l'organo target, che deve essere rigenerato.

3) **La neurotmesi** è una recisione completa sia dell'assone che del tessuto connettivo. Si può avere la formazione di un neuroma, ma non avviene alcuna rigenerazione spontanea senza un intervento chirurgico.

Nel 1951 Sunderland ha ampliato la classificazione basata sull'istologia a 5 gradi di lesione, che corrispondevano a grandi linee alla classificazione a tre livelli di Seddon, ma con una più accurata prognosi degli esiti nelle assonotmesi (Tab. 1). Le lesioni di Sunderland di gradi I e II guariscono completamente, le lesioni di grado III parzialmente, mentre le lesioni di gradi IV e V richiedono un intervento chirurgico.

- Le lesioni di Sunderland di **grado I** corrispondono alla neuroprassia.
- Le lesioni di **grado II** comportano un danno assonale ma l'endonevrio rimane intatto, perciò vanno incontro a una guarigione completa.
- Le lesioni di **grado III e IV** possono guarire spontaneamente ma con una maggiore formazione di tessuto cicatriziale e con una ripresa funzionale incompleta a causa del maggiore danneggiamento degli assoni e del tessuto connettivo. La cicatrice determina un blocco della conduzione e, se grave, richiede un'escissione e la ricostruzione del nervo. Le lesioni di grado IV solitamente richiedono un intervento chirurgico per via dei danni agli assoni e a tutte le lamine di tessuto connettivo che comportano un'eccessiva formazione di tessuto cicatriziale.
- Le lesioni di **grado V** corrispondono alla neurotmesi.

Questa classificazione ha un'utilità clinica in qualche modo limitata visto che la maggior parte delle lesioni sono di grado misto e che non esistono test diagnostici in grado di distinguere lesioni di grado I da lesioni di grado IV. Attualmente i gradi di lesione secondo Sunderland possono essere stabiliti solo istologicamente. Mackinnon e Dellon hanno modificato la classificazione di Sunderland aggiungendo delle lesioni di tipo misto (**grado VI**) che riflettono meglio la pratica clinica (Mackinnon&Dellon, 1988; Dellon, 1993). Gli studi sulla conduzione nervosa (NCS) e gli elettromiogrammi (EMG) sono dei test non invasivi che hanno un ruolo diagnostico nelle diagnosi ritardate (6 settimane dopo), quando sono presenti fibrillazioni nei muscoli denervati, ma non subito dopo la lesione. Non esiste infatti alcun test diagnostico non invasivo che possa stabilire la presenza o la gravità di una lesione di un nervo nelle prime sei settimane che fanno seguito al verificarsi della lesione stessa.

La diagnosi fa ancora affidamento all'esame clinico e/o all'esplorazione chirurgica.

NCS testa la funzionalità motoria e sensitiva tramite uno stimolatore elettrico applicato sulla pelle nei differenti punti del nervo che deve essere testato. La risposta evocata viene registrata da un elettrodo di superficie posto sopra il ventre muscolare (risposta motoria) o il nervo (risposta sensitiva).

L'EMG testa solo la funzionalità motoria e consiste nell'inserimento di un ago in un muscolo per valutare l'attività elettrica a riposo (la presenza di un'attività spontanea anormale come fibrillazioni o di sharp waves) e l'analisi dell'attività motoria volontaria. Le fibrillazioni di un muscolo denervato possono non essere evidenti per 3-6 settimane dall'avvenuta lesione, a seconda di quanto quest'ultima è più o meno prossimale.

L'NCS è utilizzato inizialmente come test di screening per stabilire la presenza/assenza di blocchi di conduzione e l'aggiunta dell'EMG fornisce importanti informazioni sotto forma di ridotti potenziali d'azione.

NCS e EMG ottenuti serialmente nel tempo possono mappare la guarigione del nervo ed identificare una neuroprassia o un'assonotmesi. La mancanza di una guarigione clinica o stabilita con NCS/EMG dopo 3-6 settimane rende necessaria un'esplorazione chirurgica. Il problema è che, arrivati a tal punto, il tempo migliore per intervenire con una riparazione chirurgica è già passato.

Gli effetti di un'assotomia o di una denervazione muscolare entrambe croniche rendono i tessuti subottimali per una buona rigenerazione assonale. Perciò se una riparazione in acuto del nervo può portare a una migliore ripresa funzionale, ritardi nell'intervento dati da un tipo di diagnostica che necessita di tempo per dare dei risultati possono avere un peso significativo (Grinsell, 2014).

Nel grado di lesione più grave, la neurotmesi, i nuovi assoni che gemmano dal moncone prossimale si trovano di fronte una massa di tessuto completamente disorganizzata. Per primo Cajal nel 1928 descrisse questa massa di tessuto connettivale e fibrotico detta Neuroma che determina un evidente rigonfiamento del moncone nervoso (Muir, 2010).

Pertanto, qualsiasi tipo di lesioni, sia parziale sia completa, può provocare neuromi post-traumatici cioè una proliferazione disordinata ed iperplastica delle cellule che rappresenta un tentativo di rigenerazione dei nervi lesionati.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

Sono spesso clinicamente palpabili, dolenti e si presentano come masse compatte e molli. Possono essere associati gonfiore e debolezza muscolare. Si riconoscono neuromi terminali e neuromi in continuità: i neuromi terminali si trovano principalmente a livello del moncone prossimale, mentre i neuromi in continuità sono osservati quando i monconi del nervo sono entrambi collegati da tessuto neoformato. La diagnosi è prevalentemente clinica. L'ecografia può essere utile ogni volta che l'esame clinico non è conclusivo o nel caso in cui debbano essere escluse altre patologie, in particolare nel post-operatorio. Si può valutare così inoltre la percentuale della zona interessata dalla lesione. Il posizionamento e la pressione applicata sul neuroma durante l'esecuzione dell'ecografia possono però provocare dolore locale e parestesia (Alessandrino, 2014).

Classification of nerve injury				
Sunderland	Seddon	Injury	Neurosensory impairment	Recovery potential
I	Neuropraxia	Intrafascicular oedema, conduction block	Neuritis, paresthesia	Full (1 day to 1 week)
		Possible segmental demyelination	Neuritis, paresthesia	Full (1 to 2 months)
II		Axon severed, endoneurial tube intact	Paresthesia, episodic dysesthesia	Full (2 to 4 months)
III	Axonotmesis	Endoneurial tube torn	Paresthesia, dysesthesia	Slow, incomplete (12 months)
IV		Only epineurium intact	Hypoesthesia, dysesthesia, and neuroma formation	Neuroma in continuity
V	Neurotmesis	Loss of continuity	Anaesthetic, intractable pain, and neuroma formation	None
VI		Combination of above	Combination of above	Unpredictable

Tab. 1. Classificazione delle lesioni nervose secondo Sunderland e Seddon, da Houshyar 2016.

1.1.3 ELETTROMIOGRAFIA (EMG)

La membrana delle cellule eccitabili è caratterizzata da differenza di potenziale tra interno ed esterno: nelle cellule muscolari è di circa 90 mV, con l'interno negativo rispetto all'esterno. Questo valore viene detto *potenziale di riposo*. Questa differenza di potenziale rende la cellula eccitabile, cioè in grado di produrre un *potenziale di azione*, che consiste in un momentaneo cambiamento nella permeabilità agli ioni e , quindi, nella differenza di potenziale, che diventa positiva all'interno (circa + 20 mV).

Per misurare correttamente questi valori, bisognerebbe applicare due elettrodi, uno all'interno e uno all'esterno della membrana: questo è possibile in campo sperimentale, ma non lo è nella pratica clinica. Quello che si può fare è utilizzare elettrodi ad ago, della dimensione dei normali aghi da iniezione, che vengono infissi nel ventre del muscolo e che per le loro

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

dimensioni si collocano nel compartimento extracellulare, dove misurano le variazioni di potenziale dovute al momentaneo cambiamento degli ioni in esso presenti. A causa delle forti resistenze offerte dal mezzo, le differenze di potenziale registrabili non saranno più dell'ordine dei millivolt, ma dei microvolt.

In un animale anestetizzato, una fibra muscolare sana, normalmente innervata da un motoneurone sano, non presenta alcuna variazione nel suo potenziale di riposo. Al contrario, ogni processo patologico a carico di:

- pirenofori degli α -motoneuroni,
- parte prossimale dei singoli assoni, che costituiscono nell'insieme la radice del nervo,
- assoni, che formano il nervo periferico,
- giunzione neuromuscolare,
- muscolo

può rendere la fibra muscolare autoeccitabile. Si può assistere quindi ad attività spontanea muscolare registrabile con l'elettromiografia, che deve essere effettuata in caso di sospetto clinico di patologie con queste localizzazioni.

L'equipaggiamento per l'elettromiografia consiste di alcuni elettrodi, un preamplificatore, un amplificatore, un monitor, un amplificatore audio e un altoparlante. Sono necessari tre elettrodi: uno attivo (positivo), uno di riferimento (negativo) e la terra. Gli elettrodi sono di vari tipi, ma in medicina veterinaria si usano quelli ad ago. Per cui i termini ago ed elettrodo vengono utilizzati indifferentemente.

L'amplificatore rende registrabili differenze di potenziale molto basse, dell'ordine di microvolt, altrimenti non rilevabili. Il preamplificatore ha due filtri, uno per tagliare frequenze più basse del segnale elettromiografico, l'altro per quelle più alte: i limiti ottimali sono 2 Hz-10 kHz. Il monitor permette la visualizzazione del segnale elettromiografico ed è necessario perché è impossibile applicare un apparato scrivente all'elettromiografo, a causa della rapidità di variazione di voltaggio. L'amplificatore audio e l'altoparlante permettono la conversione del segnale elettromiografico in suoni: l'ausilio sonoro è di grande aiuto in EMG, in quanto determinate

alterazioni producono suoni estremamente caratteristici e sono quindi riconoscibili più con l'udito che visualizzando i relativi tracciati sul monitor. Possono essere testati tutti i muscoli innervati da nervi cranici e spinali: in base al singolo caso clinico, si deciderà quali muscoli esaminare. L'esame sull'animale sveglio il più delle volte non è possibile, in quanto la ripetuta inserzione di aghi e i movimenti ad essi applicati sono per lo meno fastidiosi sull'animale. Per questi motivi, sebbene alcuni neurologi effettuino l'elettromiografia anche su animali svegli o sedati, è buona norma indurre sempre l'anestesia generale. La parte da esaminare andrebbe riscaldata, se la sua temperatura è troppo bassa. L'elettrodo viene introdotto nel ventre del muscolo. Per un esame approfondito di ogni singolo muscolo, bisognerebbe tracciare piccoli quadranti immaginari intorno all'elettrodo, ognuno dei quali va saggiato a diversi livelli di profondità. Dato che l'elettrodo registrante è in grado di rilevare l'attività elettrica patologica per un raggio di pochi millimetri intorno alla sua punta, la zona da esplorare deve essere metodicamente esaminata. È importante ricordare che le ripetute inserzioni dell'elettrodo nel muscolo possono danneggiare le fibre e provocare innalzamento dei valori sierici di CPK: la valutazione di questo parametro deve quindi precedere l'esame elettromiografico.

In un animale sano, l'introduzione dell'elettrodo provoca irritazione ed eccitazione delle fibre muscolari attraversate, che si evidenzia con un suono vivace e la comparsa sullo schermo di onde di varia ampiezza (attività inserzionale). Non appena l'operatore smette di muovere l'ago, lasciandolo infisso nel ventre muscolare, questa attività cessa e viene seguita da un silenzio elettrico e quindi dall'assenza di ogni suono, che perdura fino alla successiva manipolazione dell'elettrodo: l'animale è addormentato, è assente ogni attività muscolare sia riflessa sia volontaria, quindi non c'è nulla da registrare. Se l'ago è stato inserito in prossimità della placca neuromuscolare, si può registrare il cosiddetto "rumore di placca", dovuto alla somma di tutti i potenziali in miniatura della placca, che si visualizzano come deflessioni negative a bassa ampiezza ed alta frequenza. Se, invece, è possibile registrare una certa attività muscolare dopo la fine dell'attività inserzionale, questa è verosimilmente di natura patologica.

Nell'animale affetto da patologie neuromuscolari si possono riscontrare le seguenti anomalie:

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

- Quando l'ago viene infisso, l'attività muscolare è diminuita o assente: questo si verifica nelle lesioni di vecchia data, che hanno portato a quadri di fibrosi e cicatrizzazione del muscolo. Le fibre muscolari sono state sostituite da tessuto connettivo che, non essendo eccitabile, non può originare alcuna attività elettrica
- L'attività inserzionale continua anche dopo che l'ago ha smesso di muoversi: è il primo segno di denervazione, che rende le fibre muscolari ipereccitabili; compare in quinta giornata e declina nelle settimane successive. Possono quindi essere registrati i **potenziali di fibrillazione**. Essi sono molto variabili in durata e, forma e ampiezza e costituiscono la più comune variazione elettromiografica. Il suono prodotto ricorda quello di uova che friggono. Altro tipo di anomalie elettromiografiche sono le **onde acustiche positive** (*Positive Sharp Wave, PSW*). Queste onde sono costituite da rapide deflessioni verso il basso dell'isoelettrica, hanno ampiezza variabile e, come i potenziali di fibrillazione, possono essere dovute a patologie primitive del muscolo o secondarie alla denervazione. **Scariche anomale ad alta frequenza** sono registrabili in seguito a qualsiasi patologia e sono poco definite sia come frequenza sia come durata. Fra di esse vanno ricordate le **scariche miotoniche**, estremamente caratteristiche per il suono prodotto, che è stato paragonato a quello di un aereo bombardiere: esse sono di solito associate a malattie primitive del muscolo, quali le miotonie ma non a denervazione. Nel corso di alcune miopatie, è possibile registrare le scariche pseudomiotoniche, simili alle precedenti, più limitate nel tempo, ma di intensità costante, che ricordano il rumore di uno scooter tenuto su di giri.

L'esame elettromiografico, seppure relativamente semplice nella sua effettuazione, può presentare un elevato numero di artefatti, che possono indurre in errori diagnostici.

Con l'elettromiografia si ottengono varie informazioni che possono indirizzare il clinico:

- L'elettromiografia permette di localizzare più precisamente l'estensione della lesione; non raramente infatti i sintomi di una neuropatia sono lievi e si manifestano solo a carico di alcuni distretti; con l'elettromiografia è possibile verificare se ciò è dovuto

a effettiva ristretta localizzazione del processo patologico o, viceversa, questo è generalizzato, pur rimanendo in altre zone a livello subclinico;

- Assieme alla velocità di conduzione nervosa e alla stimolazione nervosa ripetuta, con l'elettromiografia è possibile vedere quale parte dell'unità motoria è coinvolta dalla patologia;
- È possibile avere un'evoluzione effettiva della progressione della patologia; i risultati ottenuti dopo esami ripetuti possono quindi essere confrontati, per osservare il decorso della malattia e formulare una prognosi;
- Fornisce un valido aiuto per effettuare una biopsia.

POTENZIALI EVOCATI

Con questo termine si definisce un'attività indotta dalla stimolazione elettrica di vie nervose. Negli animali in anestesia generale non è possibile registrare l'attività elettrica conseguente ad attività muscolare spontanea, evocabile invece in pazienti non narcotizzati. È però possibile registrare l'attività muscolare indotta da una stimolazione elettrica del suo nervo periferico, in seguito alla quale compaiono le onde M, F e H.

- Applicando uno stimolo sopramassimale in un certo punto del sistema nervoso periferico, si origina un potenziale d'azione nervoso che discende fino al muscolo, la cui contrazione è rappresentata dall'onda M.
- Lo stimolo applicato al nervo non si propaga solo in direzione centrifuga, ma anche in senso centripeto: il potenziale d'azione raggiunge il pirenoforo nel midollo spinale e da qui ridiscende verso il muscolo generando l'onda F.
- Infine il potenziale d'azione centrifugo, che ha provocato l'onda M, innesca per meccanismo riflesso un potenziale d'azione, che risale lungo una fibra afferente sensitiva, per poi ridiscendere lungo l'assone del motoneurone e provocare l'attività muscolare evidenziata dall'onda H.

Le tre onde compaiono in tempi successivi, proporzionali al tragitto compiuto dal potenziale d'azione che le ha originate. Dato che l'integrità

anatomofunzionale dei segmenti nervosi attraversati dal potenziale d'azione è indispensabile per la formazione delle varie onde, la registrazione dell'attività muscolare, indotta da stimolazione elettrica del nervo periferico, è utile per esplorare, volta per volta, differenti e limitati tratti del SNP al fine di localizzare con precisione la lesione. L'assenza dell'onda, una diminuzione della sua ampiezza, un aumento della sua latenza e una variazione della sua durata sono indicative di stati patologici.

Gli studi relativi alle onde F ed H non si effettuano di routine. Al contrario, l'evocazione dell'onda M si effettua frequentemente per la misurazione della velocità di conduzione nervosa motoria (MNCV). La comparsa dell'onda M significa che la stimolazione nervosa si è trasmessa al muscolo, cioè che il potenziale d'azione nervoso si è trasmesso al muscolo, cioè che il potenziale d'azione nervoso, arrivato alla placca neuromuscolare, ha causato la liberazione di quanti di ACh che, a loro volta, hanno originato il potenziale d'azione muscolare. Misurando la distanza tra punto di stimolazione del nervo e punto di registrazione muscolare e conoscendo il tempo intercorso tra stimolo e comparsa dell'onda M, si può calcolare la velocità di conduzione dello stimolo. Tale velocità non è però clinicamente significativa, poiché rappresenta la media di tre velocità distinte: velocità di conduzione nervosa, velocità a livello sinaptico ("ritardo sinaptico") e velocità di conduzione muscolare. Ai fini clinici, è interessante conoscere la velocità di conduzione nervosa, per cui generalmente si stimola il nervo in due punti, uno più prossimale e uno più distale, più distanti possibili tra di loro, mantenendo fisso il sito muscolare di registrazione. La differenza tra le due velocità rappresenta la velocità di conduzione nel tratto di nervo compreso tra i due siti di stimolazione.

Stimolazioni ripetute dello stesso nervo (RNS), apportate a una frequenza tale da permettere, in condizioni fisiologiche, i normali processi di ricostituzione delle vescicole di ACh (3 Hz), dovrebbero dare origine ad una serie di onde M uguali tra di loro. Se questo non avviene, si sospettano patologie della giunzione neuromuscolare.

1.2 ANATOMIA E FISIOPATOLOGIA

1.2.1 STRUTTURA MICROSCOPICA DEI NERVI PERIFERICI

I nervi periferici sono fasci di fibre nervose avvolti da guaine connettivali che permettono al sistema nervoso centrale di relazionarsi con il mondo, veicolando stimoli sensitivi provenienti dall'esterno e dirigendo il movimento dei segmenti corporei in risposta a tali stimoli. Ad occhio nudo i nervi appaiono come cordoni cilindrici biancastri.

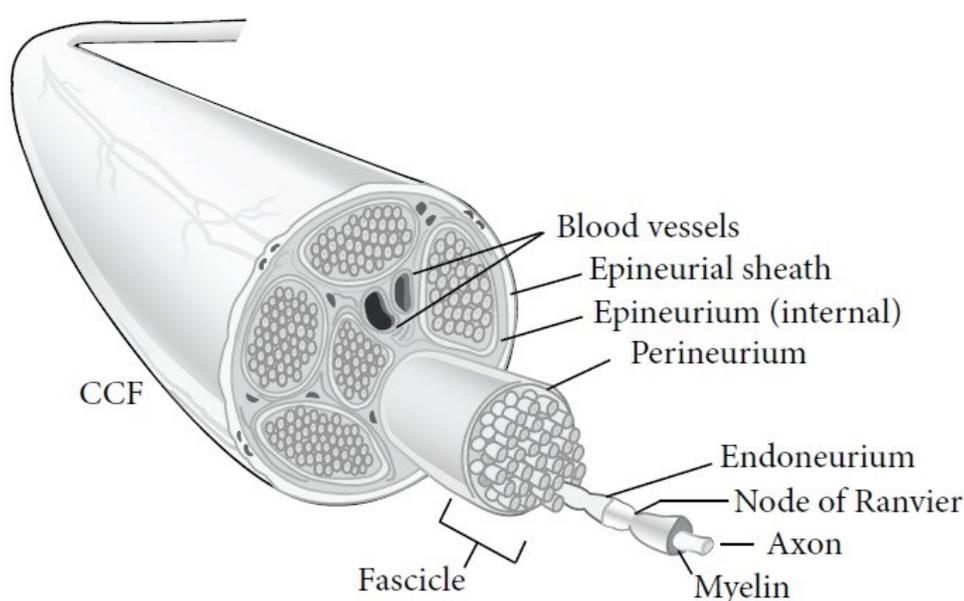


Fig 1. Anatomia nervo periferico, da Grinsell (2014).

Le fibre nervose contenute in un nervo risultano suddivise in gruppi detti fascicoli e gli stessi fascicoli formano più gruppi fascicolari. All'interno del fascicolo gli assoni sono circondati da un tessuto connettivale lasso detto endoneurio, mentre all'esterno ogni singolo fascicolo è delimitato da una guaina connettivale detta perineurio. Infine la guaina connettivale più esterna prende il nome di epineurio che contiene i vasa nervorum e può essere distinto in due parti: l'epineurio interno che circonda i gruppi fascicolari e l'epineurio esterno che racchiude tutto il nervo.

Una singola fibra nervosa è costituita dall'assone di un neurone motorio o sensitivo, dal rivestimento fornito dalle cellule di Schwann e dalla lamina basale di queste ultime. La lamina basale è costituita da uno strato interno

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

ricco di laminina e da uno strato esterno formato da una delicata rete di fibre reticolari. Le cellule di Schwann, sono cellule gliali, cioè cellule non neuronali che svolgono funzioni di sostegno nel tessuto nervoso.

Esse possono semplicemente circondare la fibra con un esile lembo citoplasmatico e in tal caso si parla di fibre amieliniche; sono fibre di questo tipo le fibre che veicolano la sensibilità termo-dolorifica e le fibre vegetative.

Al contrario, nelle fibre mieliniche, la membrana citoplasmatica delle cellule di Schwann avvolge più volte l'assone formando uno spesso rivestimento costituito da una serie di lamelle concentriche di fosfolipidi di membrana (Fig. 2). Lo strato più esterno della guaina contiene il nucleo, il citoplasma e gli organelli citoplasmatici della cellula di Schwann e prende il nome di neurilemma. La guaina mielinica, che è tipica delle fibre motrici e delle fibre per la sensibilità propriocettiva e tattile-pressoria, permette una più rapida ed efficiente conduzione nervosa rispetto alle fibre amieliniche. Le cellule di Schwann non formano una guaina continua intorno all'assone, ma restano dei piccoli intervalli di circa 1 μm tra una cellula e l'altra che vengono detti nodi di Ranvier. Ogni tratto di fibra compreso tra un nodo e l'altro, detto segmento internodale, è avvolto da una singola cellula di Schwann. La mielinizzazione delle fibre nervose periferiche inizia verso la fine del 4° mese di vita intrauterina a livello delle radici dorsali e ventrali dei nervi spinali e da lì si estende a tutti i nervi periferici.

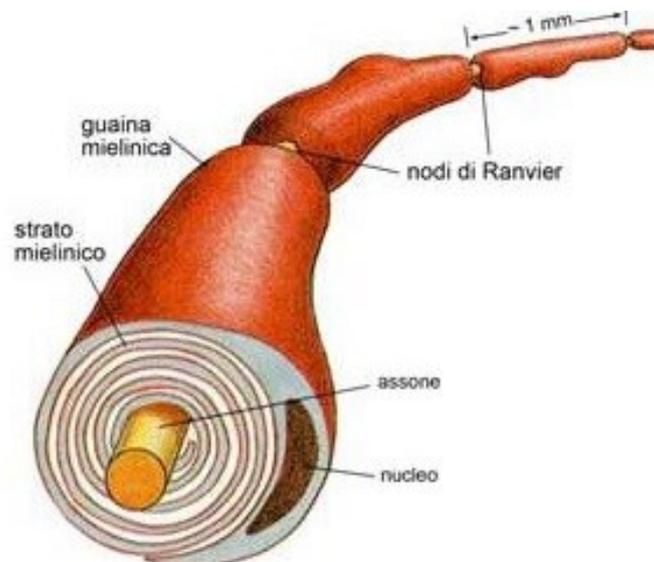


Fig 2. Struttura della fibra nervosa mielinica.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

All'interno di un nervo possono decorrere soltanto fibre nervose efferenti motorie (nervo motorio), soltanto fibre afferenti sensitive (nervo sensitivo) o entrambi i tipi (nervi misti). In particolare le fibre sensitive originano dai neuroni sensitivi che si trovano ubicati nei gangli dorsali e vanno a formare le radici posteriori dei nervi spinali, mentre gli α -motoneuroni che sono collocati nelle corna anteriori della sostanza grigia midollare, danno origine alle fibre motorie che decorrono nelle radici anteriori dei nervi spinali. Quindi, ogni assone che emerge dal corpo cellulare neuronale deve estendersi per un lungo tratto contenuto negli involucri dei nervi periferici per poter raggiungere gli organi periferici che deve innervare, siano essi muscoli, organi propriocettivi, organi sensitivi cutanei o visceri. Gli assoni dipendono metabolicamente dal corpo cellulare, per questo motivo esiste un continuo trasporto bidirezionale di macromolecole lungo tutto l'assone. Si distinguono un trasporto assonale anterogrado che dal corpo cellulare conduce fino al terminale assonico proteine, enzimi, organelli citoplasmatici, subunità citoscheletriche e frammenti di membrana citoplasmatica, e un trasporto retrogrado che conduce al corpo cellulare prodotti di scarto e anche fattori di crescita provenienti dalla periferia. Il trasporto assonale in entrambi i sensi avviene grazie all'impalcatura fornita dal citoscheletro assonale costituito da microfilamenti di actina, microtubuli di tubulina e filamenti intermedi o neurofilamenti; le macromolecole trasportate si muovono scorrendo lungo i microtubuli.

1.2.2 FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Il sistema nervoso periferico è composto da neuroni motori e neuroni sensitivi i cui corpi cellulari sono situati nel midollo spinale; da qui si dipartono delle lunghe estensioni citoplasmatiche chiamate assoni che portano gli impulsi nervosi agli organi target. Gli assoni sono raggruppati insieme in gruppi motori o sensitivi chiamati fascicoli. I singoli assoni sono circondati da una lamina di tessuto connettivo, l'endonevrio, e i fascicoli sono separati dal perinevrio (Grinsell, 2014).

L'epinevrio, il perinevrio e l'endonevrio sono le strutture di tessuto connettivo che proteggono le fibre nervose, fornendo loro "un'impalcatura". Questa intelaiatura varia lungo la distribuzione del nervo: nella porzione prossimale tende ad essere monofascicolare e a contenere sia le fibre

nervose motorie che quelle sensitive, nella porzione distale invece tende ad essere polifascicolare e a dividersi in apposite subunità specializzate per la componente nervosa e per quella sensitiva. L'apporto di sangue ai nervi periferici deriva dai vasi segmentali estrinseci e da quelli longitudinali intrinseci che originano dalle arterie regionali. Nonostante ci siano molte connessioni tra i vasi estrinseci e quelli intrinseci, i nervi periferici, in seguito alla grande mobilizzazione che avviene durante la chirurgia, dipendono primariamente dall'apporto di sangue fornito dai vasi intrinseci. Inoltre, un'eccessiva tensione che potrebbe venire a crearsi lungo il nervo potrebbe significativamente compromettere l'apporto di sangue intrinseco (Pabari, 2010).

Il microambiente presente all'interno di un neurone, come in tutte le cellule, possiede un'omeostasi elettrolitica attentamente controllata. Il trasporto assoplasmatico anterogrado e quello retrogrado portano avanti e indietro, dal corpo cellulare all'estremità dell'assone, neurotrasmettitori ed elementi cellulari strutturali. Qualsiasi rottura o difetto della membrana bilayer lipidica di un neurone o di un assone, a meno che questa non venga riparata rapidamente, risulta in una cascata di eventi che portano alla morte cellulare programmata (Grinsell, 2014).

Il SNP ha un potenziale di rigenerazione superiore rispetto al SNC. Ciò è dovuto soprattutto alle differenti risposte al danno messe in atto dalle rispettive cellule gliali. La glia del SNP, costituita dalle cellule di Schwann (Scs), si converte in un fenotipo rigenerativo in modo da promuovere la formazione di una lamina basale e da fornire abbondanti impulsi per stimolare una risposta rigenerativa da parte dei neuroni.

Una lesione del nervo si differenzia dalla maggior parte degli altri tipi di lesione dei tessuti del corpo, dal momento che non è solo necessario un processo di riparazione locale. In seguito alla lesione di un nervo periferico, si osservano infatti numerosi cambiamenti cellulari e molecolari a livello del corpo cellulare (radici ventrali e dorsali), del sito della lesione (moncone prossimale e distale) e dell'organo target.

Il corpo cellulare

Probabilmente il primo segnale ricevuto dal corpo cellulare neuronale in seguito ad una lesione assonale è dato da una attività elettrica antidromica costituita da una scarica ad alta frequenza di potenziali d'azione, che è in grado di aprire i canali del calcio ed iniziare la cascata delle Jun-kinasi che influenza la trascrizione. Dal momento della lesione, dalle prime ore a pochi giorni, si verificano così modificazioni morfologiche nei neuroni corrispondenti, che includono gonfiore del corpo cellulare, spostamento del nucleo alla periferia, e scomparsa del materiale basofilo dal citoplasma, un fenomeno definito *cromatolisi*. Il maggiore determinante della sopravvivenza del neurone sembrerebbe comunque essere la perdita del sostentamento neurotrofico derivante dall'organo target. I cambiamenti metabolici all'interno del corpo cellulare neuronale determinano il passaggio da meccanismi di trasmissione degli impulsi nervosi verso la produzione di sostanze necessarie a ricostruire e riparare il nervo danneggiato.

Questo conduce ad una imponente risposta che coinvolge sia l'espressione genica che delle proteine. L'equilibrio di questi fattori può portare alla sopravvivenza del neurone e al suo tentativo di rigenerazione o può risultare nella sua morte apoptotica. I neuroni di senso primari sono significativamente più sensibili all'apoptosi rispetto ai motoneuroni spinali, visto che il 40% dei neuroni dei gangli delle radici dorsali muore in seguito ad una lesione. Il tempo necessario affinché una cellula nervosa muoia, essendo relativamente lungo, apre le porte ad una finestra temporale clinicamente rilevante per mettere in atto varie opzioni neuroprotettive.

La sede del danno

Il moncone distale del nervo danneggiato va incontro ad una serie di cambiamenti molecolari e cellulari noti come "*Wallerian degeneration*" (Fig 3), dopo che Augustus Volney Waller 160 anni fa, ha descritto i cambiamenti morfologici nei nervi faringeo e ipoglosso sezionati di rana. Nel giro di poche ore il moncone prossimale si retrae e il neurone, ora privo dei normali bersagli sinaptici diventa vulnerabile a morte retrograda per apoptosi; mentre, sia l'assone che la mielina nel moncone distale, vanno incontro a degenerazione e i macrofagi migrano nella sede del danno contribuendo all'eliminazione dei detriti. Nelle prime 24 ore, le cellule di Schwann proliferano e modificano il proprio fenotipo: non provvedono più alla

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

produzione di mielina, ma alla rigenerazione; mostrano inoltre una up-regulation di numerose molecole che aiutano i processi degenerativi e rigenerativi che avvengono in parallelo. In particolare, le cellule di Schwann denervate, da una parte, operano una down-regulation su proteine strutturali come la proteina zero della mielina (P0), la proteina basica mielinica e la glicoproteina associata alla mielina; dall'altra, operano una up-regulation su molecole di adesione cellulare neurali (L1CAM), proteina fibrillare acida della glia (GFAP), fattori di crescita del nervo (NGF), fattore neurotrofico cerebrale (*Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), fattore neurotrofico derivante dalla glia (*Glia derived neurotrophic factor*, GDNF), fattore di crescita basico dei fibroblasti (*Basic fibroblast growth factor*, bFGF) e la neurotrofina3 (NT-3). Una volta che i detriti sono stati rimossi grazie all'azione combinata di macrofagi e cellule di Schwann, queste ultime proliferano e si allineano formando delle colonne chiamate strie/bande di Bungner guidando i germogli assionali in rigenerazione all'interno delle membrane basali verso i loro bersagli. Questo crea un ambiente permissivo ricco in fattori trofici che attiva la rigenerazione assonale guidata (Faroni, 2014).

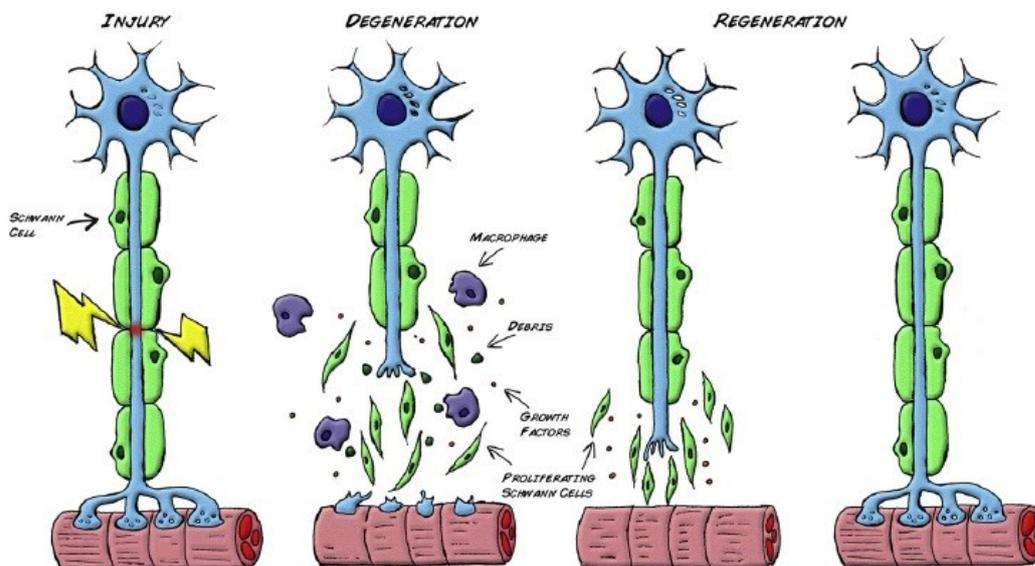


Fig 3 Degenerazione Walleriana, da Faroni,2014

L'organo target

Distalmente alla sede del danno, si creano numerosi ostacoli che rendono difficile la reinnervazione dell'organo target da parte dell'assone in

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

rigenerazione. Un eventuale indirizzamento verso l'organo target sbagliato riduce le possibilità di un risultato efficace anche qualora sia presente un buon numero di assoni rigenerati. Una perdita di contatto neuronale nel moncone distale porta a una denervazione cronica delle cellule di Schwann le quali inducono una minore produzione di fattori di crescita ed entrano in uno stato dormiente, divenendo incapaci di supportare la progressione assonale. In modo simile, l'organo target denervato è a corto di fattori trofici, le sue fibre muscolari divengono atrofiche e le cellule satellite vanno incontro ad apoptosi. Questi meccanismi hanno un impatto significativo sulla possibilità di una ripresa funzionale in seguito ad una lesione prossimale del nervo (Faroni, 2014).

Quando gli assoni rimangono senza collegamento al loro tessuto bersaglio per periodi significativi nel tempo perdono la capacità di rigenerarsi, e viene persa la possibilità di recupero funzionale. Una completa atrofia avviene tra le 2 e le 6 settimane dalla denervazione.

La fibrosi si verifica nelle fibre motorie da 1 a 2 anni e la frammentazione e la disintegrazione si verificano in 2 anni. È generalmente accettato che il recupero funzionale diminuisce se il nervo non raggiunge la placca motoria terminale in 12 mesi. Gli inibitori molecolari della crescita degli assoni sono stati collegati in particolare a tre componenti principali della lesione: la cicatrice fibrotica, il tessuto gliale cicatriziale e la mielina danneggiata. Le due grandi classi di inibitori della rigenerazione del sistema nervoso centrale sono gli inibitori mielina-associati (MAIs) e i proteoglicani condroitin-solfato. Queste molecole limitano la rigenerazione assonale e interferendo con la loro funzione, riescono a conseguire un certo grado di crescita nell'adulto. Così, la mancanza di supporto neurotrofico contribuisce alla mancanza di rigenerazione spontanea nel SNC. Quando si verifica un gap nervoso che non può essere riparato da una sutura end-to-end senza tensione, il metodo di riparazione corrente è un innesto autologo suturato di un altro nervo di minore importanza funzionale. Tuttavia, l'uso di innesti autologhi presenta diversi svantaggi quali la necessità di un secondo sito chirurgico, la perdita della funzione del nervo donatore, una quantità limitata di nervi donatori e talvolta una mancanza di corrispondenza tra i nervi (Konofaos, 2013).

1.3 STATO DELL'ARTE

1.3.1 OPZIONI TERAPEUTICHE

L'obiettivo del trattamento di una lesione nervosa è quello di ristabilire l'originale funzionalità creando le condizioni per una rigenerazione assonale massimale ed una reinnervazione specifica degli organi bersaglio. La chirurgia delle lesioni nervose periferiche rappresenta ancora oggi un campo di intensa ricerca e una strategia ottimale non è stata ancora individuata.

Spesso, i trattamenti chirurgici di lesioni ai nervi periferici sono tutt'altro che soddisfacenti. Per anni l'approccio chirurgico più utilizzato è stato la sutura termino-terminale dei due monconi nervosi. Tuttavia nei casi di grossa perdita di tessuto nervoso, il semplice riaccostamento dei monconi e la loro sutura diretta porta inevitabilmente il nervo a stress tensionale con scarsi risultati funzionali. La sutura diretta dei due monconi, detta anche *neurorrafia*, è stata il primo approccio chirurgico utilizzato per le lesioni nervose. Attualmente una meticolosa riparazione microchirurgica tramite l'utilizzo di suture epineurali a scarsa tensione rappresenta il trattamento di scelta quando il gap è piccolo e le due estremità possono essere avvicinate in assenza di tensione. La sutura diretta può essere eseguita attraverso diverse tecniche microchirurgiche.

Una strategia di riparazione nervosa alternativa alla sutura è l'innesto nervoso (*nerve graft*), cioè l'utilizzo di un segmento nervoso prelevato da un nervo donatore sano e posto a ponte della lesione.

Ad oggi l'innesto nervoso autologo rappresenta il "gold standard" per le lesioni in cui una sutura "*tension-free*" risulta impossibile a causa della grossa perdita di tessuto nervoso (gap > 5 cm). Gli innesti nervosi possiedono cellule di Schwann che ricercano attivamente l'assone in rigenerazione, ed una lamina basale che garantisce un microambiente adiuvante per la ricrescita nervosa, ma purtroppo ci sono diverse limitazioni dettate dalle complicazioni associate ad essi:

- la raccolta di un innesto di nervo donatore può avere significativa comorbilità;
- il nervo donatore è spesso un nervo sensitivo più piccolo che limita, fin dall'inizio, un recupero completo quando a richiedere il trattamento è un nervo motore più grande e importante;

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

- difficoltà crescente nell'ottenere il consenso del paziente all'innesto (sacrificio di un proprio nervo sano in un altro distretto corporeo) gravata dalla comorbidità per il sito donatore e dalla limitata garanzia di successo dell'innesto stesso.
- le due suture (una prossimale ed una distale) che fissano l'innesto possono essere sede di una sfavorevole proliferazione fibroblastica che ostacola la progressione dei sottili assoni rigeneranti (eventualità davvero sfavorevole per quelli che erano già riusciti a passare la barriera della prima sutura per poi bloccarsi sulla seconda) (Merolli, 2011).

Un'alternativa al trapianto autologo è quello eterologo, ma può portare al problema ancora maggiore della necessità di una terapia immunosoppressiva a vita. Sono ora disponibili in commercio una nuova classe di allotrapianti commerciali non-immunogenici per l'ospite, dal momento che sono così altamente trasformati che rimane solo la struttura carica di laminina dei fascicoli del nervo originale; questo trattamento le assimila a guide neurali artificiali multicanalizzate (Merolli, 2010). Inoltre, le lesioni nervose dovrebbero essere riparate il prima possibile; infatti riparazioni tardive si sono rivelate essere deleterie per una soddisfacente guarigione sia sensoriale che motoria. Nonostante i grandi progressi nella comprensione della neurofisiopatologia, i principi del trattamento clinico delle lesioni dei nervi non sono cambiati negli ultimi trent'anni e i corrispondenti risultati clinici rimangono scarsi. È diventato evidente che un approccio meramente microchirurgico alla riparazione del nervo sia destinato a fallire perchè non tiene conto del complesso di eventi cellulari e molecolari che accompagnano la rigenerazione dei nervi periferici (Faroni, 2014).

Studi clinici in cui si è implementato l'utilizzo di guide nervose artificiali hanno portato a risultati quasi migliori di quelli ottenuti con gli autotrapianti. Pertanto, lo sviluppo di guide neurali che possano essere in grado di eguagliare l'efficacia di trapianti di nervo autologhi, sarebbe un fattore molto vantaggioso nel campo della chirurgia dei nervi periferici (Nectow, 2011).

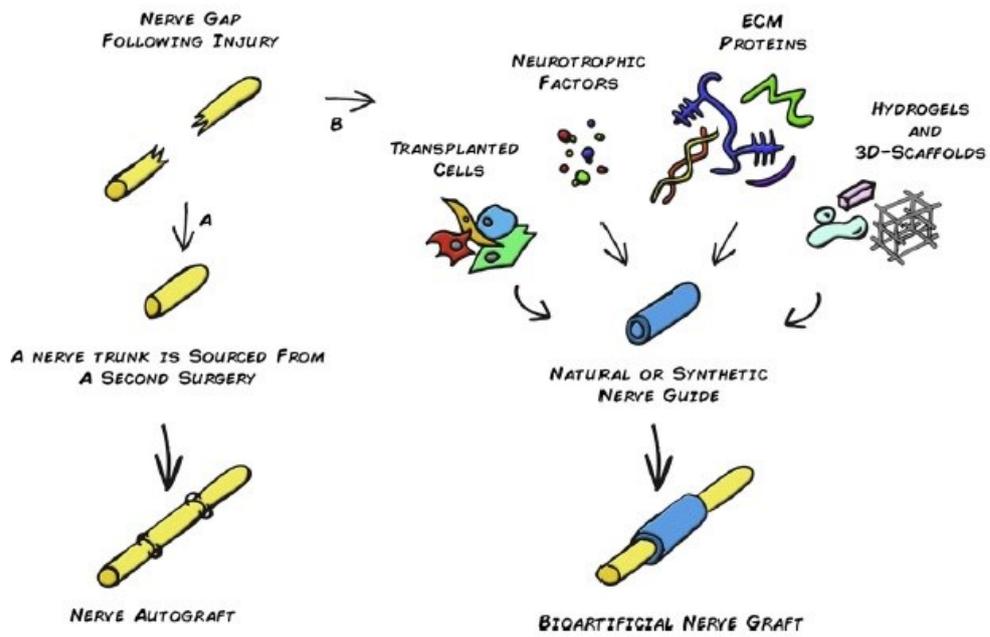


Fig 4. Autotrapianto vs. Guide Neurali, da Faroni (2014).

STIMOLAZIONE ELETTRICA

Esistono pochi report sull'applicazione di campi/ gradienti elettrici su un nervo periferico riparato per velocizzare la rigenerazione assonale. Studi condotti su animali dimostrano che anche solo un'ora di stimolazione elettrica del nervo subito dopo la riparazione di un nervo femorale di ratto reciso promuove un enorme miglioramento della cinetica della reinnervazione del muscolo target. In uno studio clinico pilota, è stata applicata un'ora di stimolazione elettrica in seguito a decompressione del nervo mediano a livello del polso in 21 pazienti con sindrome del tunnel carpale e atrofia tenare. Il gruppo in cui è stata applicata la stimolazione elettrica ha mostrato una rigenerazione assonale e una reinnervazione più rapide; ciò è stato provato tramite una stima del numero di unità motorie e da studi sulla condizione sensitiva e motoria (Houschyar,2016).

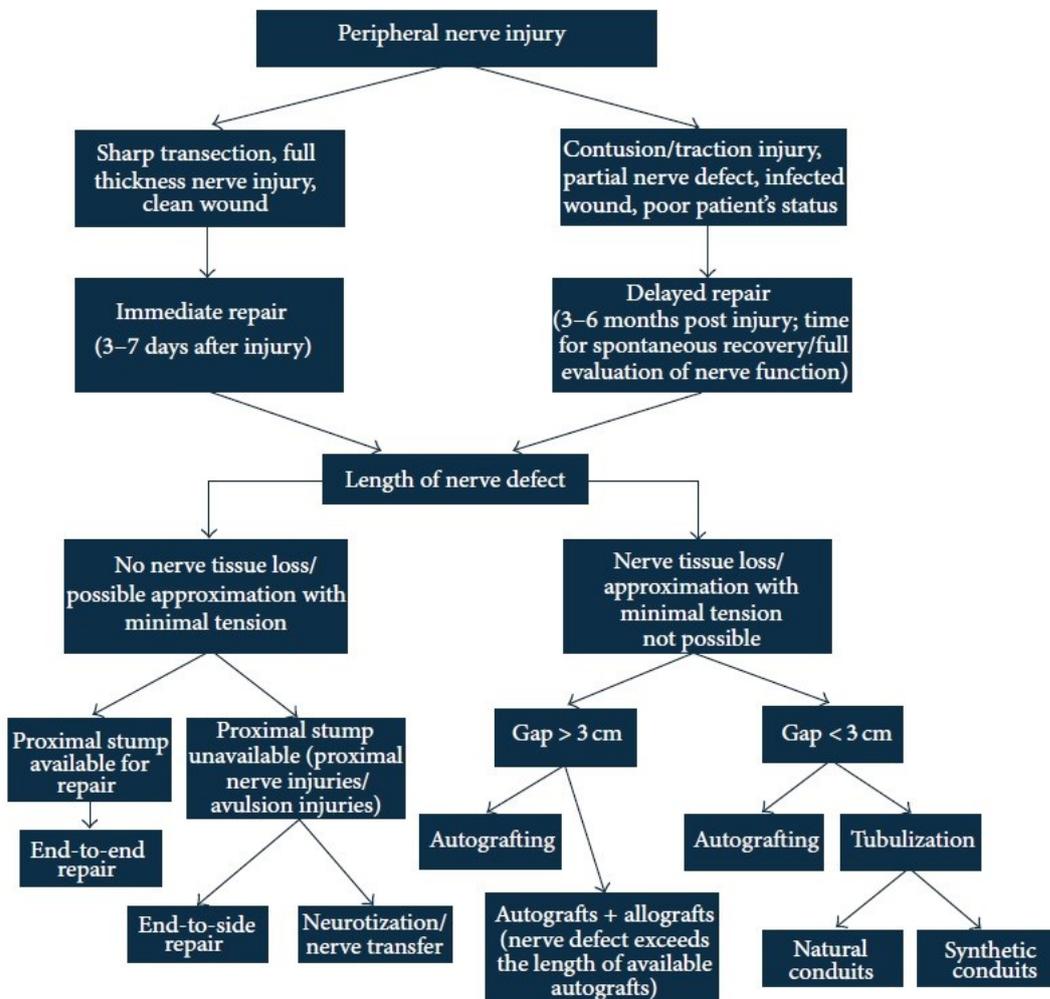


Fig 5. Algoritmo chirurgico per la riparazione del nervo periferico, da Grinsell & Keating (2014).

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

1.3.2 TUBULIZZAZIONE

Le guide neurali artificiali (o condotti) sono state introdotte nella pratica clinica più di 20 anni fa; si tratta di condotti cilindrici all'interno dei quali un moncone del nervo in rigenerazione può trovare una protezione e una guida (Merolli, 2010).

Un trauma ad un nervo periferico può provocare lesioni senza gap o lesioni con spazi tra i monconi del nervo. In presenza di un difetto del nervo, il posizionamento di un innesto nervoso autologo è lo standard corrente per il ripristino del nervo. L'impiego clinico di tubi come alternativa a innesti nervosi autologhi è giustificato, come abbiamo detto, principalmente dalla limitata disponibilità del tessuto nervoso donatore per il trapianto nervoso e dalla loro morbidità associata (Konofaos, 2013).

Una panoramica del risultato clinico ha mostrato che le guide nervose artificiali svolgono un'azione buona almeno tanto quanto autotrapianti in lesioni dei nervi periferici in cui i gap non sono più lunghi di 20 mm; in questi casi hanno il vantaggio di evitare il sacrificio del sito donatore e la morbidità e di fornire una tecnica chirurgica semplice e veloce (Merolli, 2010).

Quindi, soprattutto per riparare difetti più grandi, è necessario lo sviluppo di trattamenti alternativi in modo da colmare il divario tra il moncone nervoso prossimale e quello distale. La tubulizzazione, che fornisce un rivestimento a carico dei monconi di un nervo reciso tramite un tubo, offre una guida per gli assoni rigeneranti verso il moncone distale.

Il concetto del tubo si basa sui seguenti principi:

- 1) la rigenerazione nervosa sarà favorita se il trauma chirurgico è ridotto al minimo;
- 2) una breve distanza tra i monconi terminali all'interno del tubo aumenterà le possibilità di azione dei meccanismi neurotrofici e neurotropi;
- 3) un sistema tubulare chiuso potrà permettere un accumulo di fattori neurotrofici che sono normalmente sintetizzati in un tronco nervoso dopo il trauma e prevenire interferenze da parte dell'ambiente circostante.

Sono stati fatti molti tentativi per colmare i gap nervosi periferici periferico tramite vari condotti nervosi. La maggior parte degli studi hanno usato modelli con gap breve di meno di 25 mm (Evans, 1999; Bora, 1997). I pochi studi su gap più lunghi hanno portato a scarsi risultati simili agli autotrapianti (Suzuki, 1999; Sinis, 2007; Terzis, 2010). C'è stato solo un report di condotto

artificiale funzionale di successo applicato ad uno spazio di 80 mm nel cane. In questo studio, Matsumoto et al. hanno riportato una rigenerazione nervosa di successo, utilizzando un tubo riempito con acido di collagene poliglicolico (PGA) con fibre rivestite di laminina collagene, attraverso un gap nervoso di 80 mm nel nervo peroneo di cane dopo 12 mesi di follow-up (Matsumoto, 2000).

Una rigenerazione di successo dopo la tubulizzazione dipende dalla formazione di un nuovo scaffold di matrice extracellulare su cui migrano vasi sanguigni, fibroblasti e cellule di Schwann e formano una nuova struttura nervosa. La rigenerazione fallisce con elevata probabilità in caso di gap lunghi (superiori a 3 cm) perché sono state superate le capacità di rigenerazione dei monconi del nervo e le cellule di Schwann non sono in grado di fornire un ambiente idoneo per l'allungamento assonale. Usando una guida nervosa, la guida agli assoni in rigenerazione non è raggiunta solo tramite un effetto meccanico (la parete e il lume della guida neurale), ma anche da un effetto chimico (accumulo di fattori neurotrofici e neurotropici). Questa combinazione di fattori chimici, fisici e biologici ha creato lo sviluppo di un tubo nervoso all'interno di un processo complesso che richiede una stretta collaborazione di bioingegneri, neuroscienziati e chirurghi dei nervi periferici. L'ingegneria del tubo ideale per colmare grandi gap nervosi rimane una sfida (Konofaos, 2013).

1.3.2.1 CENNI STORICI SULLE GUIDE NERVOSE

L'impiego di tecniche di tubulizzazione ha visto importanti progressi nel corso degli ultimi 30 anni. Nel corso del 19° secolo gli scienziati hanno studiato sperimentalmente la possibilità di utilizzare un condotto non nervoso per colmare un difetto nervoso. Nel 1880, Glück per primo ha utilizzato il canale centrale decalcificato di osso per fornire un percorso tra i monconi di un nervo diviso. Sulla base di questo studio, Vanlair, nel 1882 ha utilizzato un osso decalcificato come tubo per riempire un gap di 3 cm nel nervo sciatico di un cane. L'esame istologico ha mostrato la rigenerazione dei nervi che ha sostituito l'osso riassorbito distalmente. Bugner nel 1891 ha riportato l'utilizzo di innesti arteriosi umani per colmare lacune nervose nel cane. Notthaft, nel 1893, ha tentato di colmare un gap nel nervo sciatico di conigli utilizzando l'aorta del coniglio, ma senza alcun segno di rigenerazione.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

Willard, nel 1894, ha eseguito una procedura di tubulizzazione utilizzando osso decalcificato. Nel 1904, Foramitti, e nel 1915 Nageotte hanno osservato la rigenerazione iniziale del nervo in un trapianto arterioso e venoso seguito da successiva disgregazione del trapianto. Wrede, nel 1909, ha introdotto l'uso del condotto venoso per sostenere la rigenerazione dei nervi attraverso i gap nervosi. Weiss e Taylor, nella metà del secolo scorso, nel tentativo di dimostrare che la rigenerazione nervosa era indipendente da fattori trofici e trofici, ha utilizzato nei loro esperimenti materiali biologici (da arterie, fresche o liofilizzate e reidratate) insieme a condotti artificiali di tantalio.

La ricerca secolare per il condotto nervoso ideale ha compreso l'uso di materiali biologici autogeni ed esogeni e l'uso di materiali artificiali. Dal primo tentativo, sono stati provati molti materiali per la creazione di guide neurali biologiche. Le categorie di condotti nervosi includevano condotti biologici autologhi, condotti biologici non autologhi, e condotti non biologici. Mackinnon e Dellon (Mackinnon, 1986, 1990; Dellon, 1988) sono stati i primi a studiare la rigenerazione dei nervi nelle scimmie confrontando i risultati elettrofisiologici del nervo trapiantato versus riparazioni del condotto con acido poliglicolico, utilizzando condotti biorisorbibili di varia lunghezza. Entrambi gli studi hanno dimostrato che il nervo periferico del primate può rigenerare tutto un gap di 3 cm quando guidato da un condotto nervoso adeguato.

Le guide nervose contemporanee sono per lo più realizzate con materiali biodegradabili, come poliesteri alifatici o poliuretani, collagene, chitosano, o vene prelevate. Tuttavia, il silicone è da tempo il materiale più utilizzato per la fabbricazione di guide nervose, ma la sua mancanza di degradabilità e relativa rigidità ne hanno limitato l'utilizzo. Più recentemente, la ricerca si è focalizzata principalmente sul miglioramento del lume della singola guida neurale per colmare le lacune nervose più grandi (più di 3 cm) (Konofaos, 2013).

1.3.2.2 PROGETTAZIONE DEL TUBO NERVOSO IDEALE

Hudson et al. (1999) hanno elencato diverse proprietà importanti che i condotti nervosi dovrebbero possedere: facilmente fabbricabili con dimensioni e topografia desiderate, impiantabili con relativa facilità e sterilizzabili. Il tubo nervoso ideale dovrebbe inoltre essere non

immunogenico, non causando né irritazione del tessuto locale né una risposta allergica.

Le categorie di condotti nervosi includono condotti biologici autogeni, condotti biologici non autogeni, e condotti non biologici.

La scelta del biomateriale e della tecnica di fabbricazione è un primo importante passo nello sviluppo di un tubo nervoso. Idealmente, il condotto del nervo deve essere **poroso** per consentire e controllare lo scambio di nutrienti, e **biodegradabile** per eliminare la necessità della sua rimozione. Inoltre, il materiale del tubo deve trovare un **equilibrio tra un adeguato tasso di degradazione e le sue proprietà meccaniche intrinseche**, che dovrebbero ridurre al minimo le risposte infiammatorie e prevenire la compressione del nervo (Griffith, 2002).

I primi condotti nervosi utilizzati nei roditori e in sperimentazione umana erano composti da polimeri non riassorbibili a base di silicone e politetrafluoroetilene (Gore-Tex) (Stanec, 1998; Braga-Silva, 1999). I potenziali svantaggi di guide nervose non riassorbibili sono un incapsulamento fibrotico permanente dell'impianto e una tardiva perdita di recupero funzionale causata dalla compressione degli assoni all'interno del condotto.

Con l'evoluzione dell'ingegneria tissutale, è stata sintetizzata una seconda generazione di condotti-guida nervosi di polimeri biorassorbibili di origine sintetica o biologica.

Anche **lo spessore della parete** è un fattore importante. Se la parete del condotto è troppo spessa, si degraderà troppo lentamente, allungando il tempo di possibile reazione da corpo estraneo. D'altra parte, una guida a parete eccessivamente sottile potrebbe degradare troppo rapidamente, con conseguente perdita precoce della struttura di sostegno.

Empiricamente, guide nervose biodegradabili con un diametro interno di circa 1,5 mm e uno spessore della parete di circa 0,3 mm hanno dato risultati ottimali per la rigenerazione dei nervi periferici.

Ancora, un'altra importante proprietà di un condotto è **la permeabilità** del tubo nervoso dato che sostanze nutritive e ossigeno devono poter diffondere nel sito della rigenerazione prima che il tubo diventi vascolarizzato. I tubi riassorbibili, quali condotti di acido poli-glicolico, hanno aumentato la permeabilità, migliorando così l'interazione del nervo con l'ambiente circostante. È stato dimostrato che questa interazione migliora la rigenerazione assonale dei nervi se confrontato con guide impermeabili.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

L'utilizzo dei tubi permeabili risulta essere positivo per motivi diversi, che includono gli scambi in tutta la parete del tubo, la diffusione nel lume della guida di fattori di crescita generati nell'ambiente esterno, la ritenzione di fattori trofici secreti dai monconi del nervo o una combinazione di tutte queste. Quindi, la dimensione dei pori della parete del condotto e la sua stabilità nel tempo sembrano essere fattori importanti nel determinare il flusso di diversi componenti che possono promuovere o inibire la rigenerazione. La permeabilità dipende dalle proprietà idrofile del materiale e dalla tecnica utilizzata.

La flessibilità è un'altra importante proprietà del tubo nervoso, in particolare nella riparazione di gaps nervosi più grandi, poiché i monconi potrebbero non essere nello stesso piano / linea e il divario che deve essere colmato potrebbe dover attraversare un'articolazione. I condotti nervosi dovrebbero quindi essere abbastanza flessibili per scivolare e piegarsi con i movimenti degli arti, ma sufficientemente rigidi da non collassare. Inoltre, il tubo nervoso ideale dovrebbe rimanere intatto per il tempo necessario agli assoni stessi di rigenerare tutto il divario tra i monconi nervosi e poi degradarsi gradualmente con gonfiore e reazione da corpo estraneo minimi. I tubi biorisorbibili che degradano troppo in fretta non possono sopravvivere per un tempo abbastanza lungo da permettere la rigenerazione e la maturazione nervosa. Se la guida del nervo si rompe in una fase iniziale, il tessuto fibroso che può formarsi all'interno del tubo può mettere in pericolo l'ulteriore maturazione del nervo rigenerato. Pertanto, la ricerca attuale è focalizzata sulle strategie per migliorare la progettazione del condotto nervoso ideale e aumentare il potenziale di rigenerazione.

1.3.2.3 MATERIALI UTILIZZATI NELLE GUIDE NEURALI

La tubulizzazione nervosa è spesso scelta come metodo di trattamento per la rigenerazione dei nervi fungendo da guida fisica e minimizzando le interazioni competitive tra miofibroblasti e crescita assonale a livello dei monconi del nervo lesionato.

L'uso di NGC artificiali è permesso dalla facilità di scelta delle dimensioni del condotto e dalla loro produzione in serie. Purtroppo, i primi studi hanno utilizzato condotti nervosi non degradabili di silicone vuoti o riempiti di soluzione salina che hanno portato solo una minima riparazione del nervo su

distanze fino a 1 cm (Rangappa, 2000). Allo stesso tempo, tali innesti non biodegradabili spesso portano alla risposta cronica del tessuto o alla compressione del nervo (Panseri, 2008). Per aggirare questi problemi sono stati utilizzati al loro posto materiali biodegradabili. Gli studi degli ultimi decenni hanno portato allo sviluppo di diversi condotti bioassorbibili approvati dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) e dalla Conformità Europea (CE) (Tab 2). Questi includono *Neurotube* (acido poliglicolico, PGA, Synovis Surgical Innovations, Deerfield, Illinois, USA), *Neurolac* (poli-DL-lattide-caprolattone, PLCL, Polyganics BV), *NeuraGen* (collagene di tipo I, Integra NeuroSciences) e *Neuro-Matrix / Neuroflex* (collagene di tipo I, collagene Matrix Inc) (Meek & Coert, 2008). Il tasso di degradazione di questi condotti varia tipicamente da mesi (*Neurotube* in 3 mesi e *NeuroMatrix* in 7 mesi) ad anni (*Neurolac* in 16 mesi e *NeuraGen* in 4 anni) (Schlosshauer, 2006). I risultati sperimentali e clinici hanno dimostrato che questi NGC bioassorbibili possono produrre risultati di ricostruzione nervosa paragonabili o addirittura superiori rispetto ai trapianti autologhi nervosi quando i gaps sono di piccole dimensioni (Weber, 2000; Navissano, 2005; Inada, 2004). La prima valutazione prospettica multicentrica randomizzata di condotti in PGA utilizzati per colmare i difetti dei nervi nella mano è stata riportata da Weber et al. (2000). Novantotto pazienti con 136 lesioni del nervo della mano sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo trattato con trapianto autologo o sutura diretta (74 nervi) e un gruppo trattato con tubuli in PGA (62 nervi). Dodici mesi dopo l'intervento chirurgico, il condotto di riparazione in PGA ha prodotto risultati significativamente migliori per gap nervosi di dimensioni inferiori a 4 mm rispetto alla riparazione end-to-end. In difetti superiori a 8 mm, il condotto in PGA ha mostrato risultati comparabili o superiori rispetto al trapianto di nervo autologo. Nel ricostruire i nervi con gap di oltre 18-20 mm, i condotti *Neurolac* e *NeuraGen* possono anche produrre una ripresa funzionale simile a quella osservata con il trapianto di nervo autologo (Bertleff, 2005; Lohmeyer, 2007).

Anche se i NGC biodegradabili possono potenzialmente eliminare reazioni infiammatorie croniche tipicamente associate a quelli non biodegradabili, il risultato generale osservato è spesso simile. La rigenerazione nervosa è spesso limitata quando condotti nervosi vuoti sono impiegati per il trattamento di lesioni con un gap superiore a un determinato livello critico (per esempio, circa 5 cm nell'uomo e 1,5 cm nei ratti) e il recupero

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

funzionale è spesso scarso. I migliori risultati clinici raggiunti finora nella rigenerazione del SNP attraverso NGC sintetici sono stati ottenuti su distanze relativamente brevi con guide nervose composte da acido poli-glicolico (PGA), poli-lattide-co-caprolattone (PLCL) e collagene (Schlosshauer, 2006). Sono stati adottati diversi approcci nel tentativo di migliorare la rigenerazione dei nervi e il recupero funzionale attraverso NGC sintetici. Nel progettare la futura generazione di condotti nervosi, particolare considerazione deve essere riposta nella selezione di un biomateriale appropriato. Le proprietà intrinseche dei materiali determinano infatti la biocompatibilità generale del dispositivo; potrebbero essere utilizzate modifiche della struttura chimica per migliorare le caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità dei condotti sintetici. Oltre alla compatibilità tissutale, un condotto nervoso dovrebbe possedere resistenza sufficiente da opporsi alla compressione o al collasso, ma deve anche essere flessibile e suturabile (Hudson, 1999). La cinetica di degradazione del condotto dovrebbe idealmente essere adattata al tasso di rigenerazione dei nervi. Alcuni dati suggeriscono che i condotti non degradabili sono meno desiderabili per la possibilità di compressione cronica del nervo che può richiedere un secondo intervento chirurgico per rimuovere il condotto o per la formazione di una capsula fibrotica attorno al dispositivo che potrebbe compromettere la rigenerazione (Mackinnon, 1984; Merle, 1989). Sono auspicabili anche facilità e riproducibilità del processo di produzione. Infine, le proprietà secondarie del condotto, come la porosità della parete, la possibilità di incorporare materiale luminale o la conduttività elettrica possono anche essere utili per migliorare la rigenerazione assonale attraverso i condotti.

I materiali utilizzati nella costruzione di condotti nervosi artificiali possono essere classificati come derivati da polimeri sintetici o da materiali naturali. I condotti nervosi derivati da vene o tessuto muscolare sono stati usati con vari gradi di successo. Le molecole della Matrice extracellulare (ECM) purificate da elementi come il collagene o la laminina hanno il vantaggio specifico di possedere proprietà di adesività o di segnalazione cellulare e possono presentare un microambiente biologicamente rilevante. D'altra parte, i polimeri sintetici hanno il vantaggio, rispetto ai materiali naturali, di avere proprietà specifiche, come il tempo di degradazione, che possono personalizzate modificando i loro pesi molecolari o le loro composizioni.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

Entrambi possono essere soggetti a modificazioni biofunzionali come l'incorporazione di fattori neurotrofici.

- **Materiali Sintetici**

- **Poliesteri Alifatici**

I poliesteri sono una classe di polimeri ampiamente studiati per diverse applicazioni biomediche. I membri di questa famiglia come l'acido poliglicolico (PGA), l'acido poli-lattico (PLA), il poli-caprolattone (PCL) e i loro copolimeri sono stati utilizzati ampiamente in vari dispositivi approvati dalla FDA, tra cui suture, sistemi di rilascio controllato di farmaci, viti e placche ortopediche. La biocompatibilità e la sicurezza di questi materiali sono stati ben dimostrati *in vivo*. I poliesteri sono comunemente sintetizzati tramite l'apertura dell'anello di polimerizzazione e vengono biodegradati *in vivo* mediante l'idrolisi dei legami esterei nella catena polimerica. Un potenziale svantaggio di questi materiali è il rilascio di sottoprodotti di degradazione leggermente acidi; tuttavia, la capacità di adattare specificatamente le proprietà polimeriche, quali velocità di degradazione e resistenza meccanica tramite copolimerizzazione, supera questo inconveniente. Di questa classe di poliesteri, solo PGA e l'acido poli-lattide-caprolattone (PLCL) sono stati sviluppati sotto l'approvazione della FDA, e sono disponibili in commercio come NGS (commercializzati come Neurotube e Neurolac, rispettivamente). L'ampia letteratura disponibile sulle proprietà dei materiali in poli-L-lattide-co-glicolide (PLGA) lo rende un materiale molto utilizzato per lo sviluppo dei nuovi condotti nervosi. Bryan et al. (2000) hanno trasformato il 85:15 PLGA in un condotto espanso con diametro interno di 2 mm e hanno riportato con successo la rigenerazione di nervo sciatico in un ratto con un gap di più di 10 mm dopo 12 settimane *in vivo*. Inoltre, la guida in PLGA è servita come un supporto adatto all'inserimento di ulteriori segnali per potenziare la rigenerazione dei nervi, come ad esempio l'incorporazione del fattore di crescita gliale o la semina di cellule di Schwann. In uno studio di follow-up, gli autori hanno riscontrato che le guide che erano state innestate con un impianto sottocutaneo una settimana prima di suturare ulteriormente il nervo sciatico mostravano una migliore rigenerazione. L'infiltrazione cellulare nelle guide innestate ha promosso la rigenerazione di un numero di

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

assoni significativamente superiore rispetto alle guide senza primer a 4 settimane post-impianto (Bryan, 2003).

NGC fabbricati in acido poli-L-lattico (PLLA) sono stati descritti da Evans et al. (1999,2000) in alternativa al PLGA. La logica era che i tubi in PLGA non possiedono una stabilità meccanica sufficiente e avevano tendenza a collassare in vivo. Al contrario, il PLLA ha un elevato grado di cristallinità e quindi è più rigido, rimanendo tuttavia biodegradabile (43% di perdita di massa dopo 8 settimane *in vitro*).

- Poli (Fosfoesteri)

Un aspetto potenzialmente importante per lo sviluppo della prossima generazione di NGC è la sintesi di nuovi materiali biocompatibili per ampliare la varietà esistente di polimeri attualmente in fase di ricerca. I potenziali svantaggi dei materiali esistenti come la perdita di stabilità meccanica dopo l'impianto, la mancanza di un controllo preciso della velocità di degradazione o il rilascio di prodotti di degradazione acidi possono essere risolti tramite progettazione razionale di polimeri. Inoltre, vi è ora un grande interesse per integrare gli NGC polimerici con farmaci o cellule in grado di aumentare la rigenerazione degli assoni o il recupero della funzionalità. Lo sviluppo di questa nuova classe di guide nervose potrebbe essere considerevolmente semplificata dallo studio di materiali che possono avere una duplice funzione e agire sia come condotto polimerico, sia come veicolo di farmaci.

Un esempio di una nuova categoria di poliestere modificato che possiede alcune proprietà interessanti è il poli-fosfoestere (PPE). Tali polimeri contengono un caratteristico legame fosfoesterico nella catena dorsale, che è più facilmente scisso per idrolisi in condizioni fisiologicamente rilevanti rispetto al legame estereo. I PPE sono stati testati *in vitro* per la compatibilità cellulare con una varietà di tipi di cellule inclusi neuroni primari e linee cellulari neuronali e i risultati incoraggianti hanno spinto Wang e colleghi (2001) a verificare l'idoneità di un tipo di PPE, (poli-bis- idrossietil-tereftalato-etil fosfoestere) come materiale per le NGC. In un ratto con gap di 10 mm del nervo sciatico sono stati impiantati condotti fabbricati con due differenti pesi molecolari del polimero ed è stata valutata la rigenerazione dopo 3 mesi: non si è osservata alcuna risposta infiammatoria visibile, ma solo una sottile capsula fibrosa formatasi attorno ai tubi. Undici dei dodici topi impiantati con NGC con peso molecolare superiore hanno mostrato una

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

risposta riflessa positiva, indicativa di recupero sensoriale. Gli autori hanno ipotizzato che le NGC con peso molecolare inferiore venivano sottoposte a frammentazione troppo rapidamente dopo l'impianto, caratteristica che le rendeva meno performanti.

Questi studi suggeriscono che il tasso di degradazione rapida dei PPE compromette la loro capacità di sostenere la rigenerazione nervosa immediatamente dopo l'impianto. Per superare questa difficoltà, sarebbe utile copolimerizzare polifosfati con un polimero più persistente, biocompatibile e biodegradabile, ma in grado di prolungare il tempo di degradazione pur mantenendo le caratteristiche desiderate dei PPE.

- Poliuretani

Per contrastare la possibilità di collasso dopo l'impianto, oltre a possedere la rigidità necessaria, un NGC dovrebbe essere anche flessibile. Un NGC flessibile sarebbe adatto per l'impianto, ad esempio, in siti soggetti a costante flessione, come le regioni articolari. Quindi Polimeri elastici quali i poliuretani (PU) sarebbero una scelta logica per la costruzione di guide neurali. D'altra parte, il PU è relativamente morbido e deve essere o copolimerizzato o fisicamente miscelato con un altro polimero più rigido per produrre un NGC in grado di mantenere la sua forma. Questi NGC sono stati testati da Robinson et al. (1991) nei modelli di nervo sciatico di ratto con gap tra 7 e 8 mm e hanno mostrato un recupero funzionale paragonabile agli autotrapianti nervosi nei topi, senza però la formazione di vaste cicatrici endoneurali come quelle create dagli autoinnesti. Borkenhagen et al. (1998) hanno utilizzato un copolimero a blocchi elastomero, il DegraPol, per fabbricare NGC di fusione-estrazione a temperatura controllata. Questo copolimero si è dimostrato essere biocompatibile e biodegradabile. Gli NGC preparati da questo copolimero sono stati impiantati in un nervo sciatico di ratto con gap di 8 mm. La velocità di degradazione delle NGC *in vivo* è risultata essere correlata con la proporzione di blocchi PHB (poli- β -idrossibutirrato) cristallizzabili nel polimero; cioè, aumentando la frazione di PHB, e quindi la cristallinità, è stata ridotta la velocità di degradazione. Tutti le guide gradualmente perdono la loro elasticità dopo l'impianto, diventando fragili e andando incontro a rottura, come risultato di rapido degrado delle regioni PGCL amorfe.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

- Polimeri Piezoelettrici

Schmidt et al (1997) e Valentini et al (1992), dimostrarono che l'esposizione ad una carica elettrica poteva migliorare la rigenerazione dei nervi. Questo ha motivato ulteriori studi sull'uso come NGC di dispositivi conduttori di elettricità, come i materiali piezoelettrici. Il loro utilizzo è di gran lunga più auspicabile poiché generano una carica transitoria in risposta a sollecitazioni meccaniche piuttosto che trasmettere semplicemente una stimolazione elettrica esterna. Sono stati messi a punto NGC poli-polarizzati mediante allungamento dei condotti di fluoruro di vinilidene (PVDF) per allineare meccanicamente i dipoli, sottoponendoli poi ad un campo elettrico (Aebischer, 1987). Le NGC sono state impiantate in un topo con un gap del nervo sciatico di 4 mm per 12 settimane. Tutte le NGC hanno mostrato la rigenerazione dei nervi, con un numero di assoni mielinizzati significativamente maggiore nei condotti polarizzati. In uno studio di follow-up, NGC piezoelettrici sono stati fabbricati da un copolimero di PVDF e trifluoroetilene (PVDF-TFE), in modo che gli NGC non richiedessero l'allungamento meccanico per allineare i dipoli (Fine, 1991). Condotti in PVDF-TFE polarizzati positivamente hanno mostrato una miglior rigenerazione del nervo sciatico di ratto con gap oltre i 10 mm rispetto ai condotti carichi negativamente o neutri, indicando che l'effetto piezoelettrico è stato, non in piccola parte, responsabile della stimolazione della crescita assonale. Nonostante questi risultati incoraggianti, tuttavia, la non degradabilità dei polimeri piezoelettrici, così come la loro insolubilità in molti solventi organici -condizione che complica il processo di lavorazione- ostacola il loro utilizzo come materiale per gli NGC. Lo sviluppo di un metodo di sintesi per la produzione di polimeri piezoelettrici biodegradabili faciliterebbe ulteriori progressi in questo settore.

- NGC a base di Idrogel

Guide nervose in idrogel sono state progettate per la riparazione del midollo spinale. L'ipotesi è che il contenuto intrinsecamente alto di acqua dell'idrogel potrebbe conferire uno stimolo meccanico che si avvicina molto a quello del tessuto nervoso originale, con il risultato di una rigenerazione più efficiente. Guide in idrogel sono state fabbricate da Dalton e colleghi (2002) a partire da poliidrossietil-metacrilato (PHEMA), che è attualmente ampiamente utilizzato come materiale per lenti a contatto morbide. Il PHEMA è stato

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

scelto in quanto si presenta relativamente inerte ed elastico, e perché si presenta biocompatibile con il tessuto neurale (Mokry, 2000; Plant, 1998). Tuttavia, l'omopolimero PHEMA è stato ritenuto troppo morbido per essere adatto all'impianto, e quindi è stato copolimerizzato con metil-metacrilato (MMA) per fornire maggiore rigidità. Le guide PHEMA-MMA hanno una struttura bifasica, con uno strato esterno simile a gel ed uno strato interno poroso, creato durante la separazione di fase delle particelle polimerizzate. La rigenerazione del nervo sciatico di ratto su un gap di 10 mm è stata testata utilizzando questi tubi come condotti guida (Belkas, 2005 a, b). Dopo 8 settimane, gli NGC in PHEMA-MMA sono rimasti pervi e non hanno provocato infiammazione significativa. Dopo 16 settimane, il 60% di NGC aveva supportato la rigenerazione del nervo con un tasso simile ai trapianti autologhi, mentre molti di quelli non rigenerati avevano collassato. Le registrazioni elettrofisiologiche prese a 8 settimane non hanno mostrato differenze significative tra gli NGC e gli autotrapianti; tuttavia, a 16 settimane il trapianto autologo aveva prodotto un recupero significativamente migliore dal punto di vista funzionale, così come indicato dalle differenze di potenziale d'azione, velocità e ampiezza. Gli NGC in PHEMA-MMA permettono la diffusione di acqua e piccole molecole e possiedono rigidità sufficiente necessaria per la sutura e per mantenere la loro forma post-impianto per un periodo maggiore a 8 settimane. Tuttavia, in uno studio successivo di impianto a lungo termine, 4 tubi su 14 sono collassati, e alcuni hanno mostrato la presenza di una capsula fibrotica e alcune cellule infiammatorie (Belkas, 2005 a, b). Sebbene fossero in gran parte biocompatibili, la non biodegradabilità di questi NGC, può portare a una reazione cronica da corpo estraneo, aspetto che può limitare la loro applicazione su ampia scala.

Al fine di affrontare il problema per quanto riguarda la pervietà delle guide in PHEMA-MMA, Katayama et al. (2006) hanno esaminato due NGC modificati nel nervo sciatico di ratto con gap di 10 mm: un NGC in idrogel a forma di tubo corrugato, ed un tubo che è stato rinforzato con una serpentina interna di PCL. I tubi con serpentina hanno mantenuto la loro forma originaria e sono rimasti pervi per 16 settimane, mentre un terzo dei tubi corrugati aveva collassato. La maggiore pervietà del tubo è stata anche associata a un recupero funzionale significativamente migliore negli animali in cui era stato impiantato il tubo a serpentina. Questo risultato indica inequivocabilmente

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

l'importanza dell'integrità strutturale del tubo nel permettere una efficiente rigenerazione dei nervi periferici.

- **Materiali Naturali**

- Collagene

Il collagene è una proteina strutturale fibrosa e costituisce il componente principale della matrice extracellulare, che comprende la maggior parte del tessuto connettivo. La natura ubiquitaria del collagene e la sua disponibilità ha portato ad un largo uso nella sua forma purificata come biomateriale per la riparazione dei tessuti. NGC fabbricati da collagene bovino sono attualmente disponibili in commercio sotto forma di *NeuraGen tube* approvato dalla FDA. L'uso di questi tubi in un nervo mediano di scimmia è stato descritto da Archibald et al. (1991, 1995) mostrando risultati paragonabili ai trapianti nervosi autologhi, e superiori alla sutura dei monconi neurali. Gli studi clinici che hanno utilizzato tubi *NeuraGen* per la riparazione di gap nervosi fino a 18 mm nella mano hanno mostrato risultati promettenti (Ashley, 2006; Lohmeyer, 2007). Nonostante questi successi clinici, non è ancora stata dimostrata l'efficacia di NGC in collagene nel colmare gap nervosi più ampi. In uno studio svolto da Stang et al. (2005), gli autori hanno dimostrato che il nervo sciatico dei topi non era in grado di rigenerare con un NGC di collagene suino I / III quando il gap era di 20 mm. La rigenerazione è stata osservata solo quando sono state addizionate cellule di Schwann.

Nel tentativo di superare la limitazione della lunghezza del gap con NGC in collagene, Yoshii e Oka (2001) e Yoshii et al. (2001) hanno esaminato fasci di filamenti di collagene come guida nervosa senza un condotto esterno. Ogni fascio era costituito da 2000 filamenti di collagene di 20 micron di diametro realizzati con collagene I purificato bovino, che sono stati miscelati con polietilenglicol-diglicidil-etero per rallentare la velocità di riassorbimento. Le estremità di ciascun fascio sono state suture in un gap di 20 mm nel nervo sciatico del ratto. Gli autori hanno ipotizzato che la migliore flessibilità e permeabilità del fascio collagene rispetto a un tubo cavo avrebbe potuto determinare una migliore rigenerazione nei gap nervosi più ampi. I nervi riparati con fasci di fibre di collagene contenevano un maggior numero di assoni mielinizzati rispetto a quelli riparati con i tubi di collagene vuoti, ma erano paragonabili a trapianti autologhi. Tuttavia, a 12 settimane

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

dall'intervento, non è stato osservato alcun recupero funzionale significativo in tutti i gruppi sperimentali.

La gelatina derivata da collagene denaturato è stata ampiamente studiata per una vasta gamma di biomateriali, come microcapsule e vettori cellulari per la somministrazione di farmaci e per la rigenerazione tissutale. Il principale inconveniente di scaffold a base di gelatina è che sono morbidi e tendono ad essere eliminati rapidamente dal sito di impianto; quindi è necessario il cross-linking per la stabilizzazione meccanica.

- Polisaccaridi.

Polisaccaridi come il chitosano, l'alginato e l'acido ialuronico sono stati studiati in una varietà di applicazioni biomediche, soprattutto come scaffold per il supporto della formazione di nuovi tessuti (Allison e Grande-Allen, 2006; Jiang, 2008; Malafaya, 2007). L'alginato è un copolimero naturale comunemente purificato a partire da alghe marine. Anche se non possiede alcuna funzione biologica nota nell'uomo, è generalmente ben tollerato e biodegradabile *in vivo*. Una caratteristica peculiare dell'alginato è che reagisce facilmente con ioni calcio formando un idrogel debole; tuttavia, si pensa che la concentrazione relativamente alta di calcio necessaria per conseguire un elevato cross-linking possa essere citotossica e dannosa per la rigenerazione neuronale. Nishimura e colleghi hanno invece utilizzato etilendiammina per rendere covalente il cross-link dell'alginato che è stato ulteriormente liofilizzato, con conseguente formazione di una schiuma porosa. Questa è stata poi impiantata in un nervo sciatico di ratto con gap di 7 mm senza sutura (Suzuki, 2000). A 18 settimane post-chirurgia, sono stati registrati potenziali d'azione motori (CMAP) dai muscoli plantari del piede nei ratti che hanno ricevuto il trattamento con schiuma di alginato. In uno studio successivo dello stesso gruppo, schiume di alginato sono state testate da sole o in combinazione con una rete di PGA protettiva nel trattamento di un difetto di 50 mm del nervo sciatico nel gatto (Sufan, 2001). Nei primi 3 mesi, i CMAP sono stati registrati con successo in entrambi i gruppi di trattamento, e dopo 8 mesi, sono stati osservati gap nervosi rigenerati in tutti gli animali di entrambi i gruppi, anche se i loro assoni mielinizzati erano più piccoli e avevano guaine mieliniche più sottili rispetto ai nervi normali. È interessante notare che le schiume di alginato potrebbero promuovere la rigenerazione nervosa anche senza sutura dei monconi del nervo o

racchiudendoli all'interno di una struttura tubolare. Anche se è abbondante e facilmente ottenibile da gusci di crostacei, il chitosano è fragile nella sua forma secca e deve essere mescolato con un materiale secondario o miscelato chimicamente prima della trasformazione in un NGC. Xie et al. (2008) hanno creato condotti con chitosano miscelato con PLA, e hanno dimostrato che la rigenerazione di un gap di 10 mm del nervo sciatico era superiore a quella ottenuta con l'uso di un tubo di silicone, ma ancora inferiore rispetto agli autotrapianti, sia in termini di superficie che come numero di assoni rigenerati. Wang et al. (2005) con l'impianto di condotti di chitosano miscelato a formaldeide e contenente filamenti in PGA in cani con gap del nervo sciatico di 30 mm, ha dimostrato che dopo 6 mesi gli animali trattati hanno mostrato un recupero funzionale paragonabile con il gruppo di controllo trattato con trapianto autologo. Tuttavia, in questo studio gli autori non hanno utilizzato condotti di chitosano senza filamenti in PGA, quindi non è possibile attribuire la rigenerazione ad uno o all'altro dei due componenti.

- Biomatrici Decellularizzate

Nonostante la morbilità del sito donatore, l'autotrapianto del nervo rimane il gold standard per la riparazione dei nervi periferici perché contiene componenti strutturali e biologici che soddisfano i requisiti del nervo periferico. D'altra parte, vi è disponibilità limitata di materiale autologo, specialmente quello necessario per il trattamento di grossi gap nervosi. Gli allotrapianti rappresentano una soluzione a questo problema; tuttavia, la risposta immunitaria dell'ospite diventa il problema principale (Rovak, 2005), rendendo necessaria la decellularizzazione degli innesti prima del loro utilizzo (Evans, 1994). In ogni caso, gli innesti nervosi acellulari mantengono la matrice extracellulare e l'organizzazione strutturale del nervo autologo, presentando un microambiente biologicamente più adatto per rigenerare gli assoni. Diversi autori hanno preparato segmenti nervosi cell-free mediante estrazione con detergente, preservando la lamina basale (Dumont e Hentz, 1997; Hudson, 2004; Ide, 1990; Sondell, 1998). Le cellule di Schwann hanno rapidamente ripopolato questi innesti e hanno sostenuto la crescita assonale, con conseguente recupero funzionale paragonabile agli autotrapianti. È stato inoltre ipotizzato da Krekoski et al. (2001) che la rimozione dei proteoglicani condroitin-solfato (CSPG) neuro-inibitori dalla lamina basale potrebbe potenzialmente migliorare la rigenerazione

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

mediante innesti decellularizzati. Gli innesti trattati con condroitinchinasi, quando utilizzati in gaps di 4 cm nel ratto, hanno mostrato alcune reinnervazioni funzionali ed è stata osservata una piccola quantità di assoni nel moncone distale del nervo dopo 12 settimane *in vivo* (Neubauer, 2007). Oltre all'utilizzo di tessuti nervosi, sono stati proposti innesti artificiali provenienti da altri tessuti decellularizzati come la sottomucosa intestinale (SIS) (Hadlock, 2001; Smith, 2004), vasi sanguigni (Chiu, 1999; Crouzier, 2009) o tessuto muscolare (Geuna, 2004; Raimondo, 2005). Come con i nervi allogeneici, questi tessuti hanno abbondante matrice extracellulare e, nel caso del tessuto muscolare, contengono fibre orientate longitudinalmente che servono come guida per gli assoni. Nonostante i successi preliminari con la rigenerazione di gap di piccole dimensioni, si pensa che la mancanza di segnali promotori di crescita a partire da tessuti non neuronali potrebbe rappresentare un ostacolo soprattutto quando applicati in gap ampi. Sono stati quindi diretti ulteriori sforzi verso il rafforzamento di questi tessuti acellulari con fattori neurotrofici che stimolano la crescita o colture di cellule di Schwann.

Nonostante l'ampio lavoro nello sviluppo e nella sperimentazione di materiali per la produzione di condotti nervosi, non vi è stato ancora un unico materiale che abbia dimostrato avere miglior potenziale rispetto all'autotrapianto dei nervi, in termini di potenziale di rigenerazione nervosa (Jiang, 2010).

Product	Material	Company	Clinical or Preclinical	Comment
NeuraGen®	Collagen Type I	Integra LifeSciences Co., Plainsboro, NJ, USA	Taras et al. Wangenstein et al. Ashley et al. Whitlock et al.	Absorbable. Good clinical data for sensory and motor recovery.
NeuraWrap™	Collagen Type I	Integra LifeSciences Co., Plainsboro, NJ, USA	n/a	Protective wrap.
NeuroFlex™	Collagen Type I	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA	n/a	Flexible. For gaps 2.5 cm or less.
NeuroMatrix™	Collagen Type I	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA	n/a	For gaps 2.5 cm or less.
NeuroMend™	Collagen Type I	Collagen Matrix, Inc., Franklin Lakes, NJ, USA	n/a	Self curling protective wrap.
NeuroTube®	Polyglycolic acid	Synovis Micro Companies Alliance, Birmingham, AL, USA	Battiston et al. Rosson et al. Duncan et al.	Absorbable. Acidic degradation limits quantity used Clinical data available for sensory and motor recovery. Risk of extrusion.
Neurolac®	Poly(D,L-lactide-co-ε-caprolactone)	Polyganics BV, Groningen, The Netherlands	Bertleff et al. Meek et al. Hernandez et al. Chiriac et al.	Absorbable. For gaps less than 20 mm. Risk of foreign body reaction.
Salutunnel™	Polyvinyl alcohol hydrogel	Salumedica LLC, Atlanta, GA, USA	n/a	Non-degradable.
AxoGuard™ Nerve Connector	Porcine intestinal submucosa	Cook Biotech, Inc., West Lafayette, IN, USA	n/a	For gaps less than 5 mm.

Tab 2. Condotti approvati FDA, da Jones 2016

1.3.2.4 MODIFICAZIONI DELLA STRUTTURA INTERNA DEL CONDOTTO

La mancanza di successo delle guide nervose sintetiche vuote nel promuovere la rigenerazione nervosa in gap ampi ha stimolato lo studio di nuovi progetti alternativi. In particolare, la rigenerazione assonale attraverso le guide nervose sintetiche richiede fattori di crescita aggiuntivi, che possono essere classificati in segnali biochimici e fisici. In termini di segnali biochimici sono spesso coinvolti fattori di crescita/neurotrofici, cellule, acidi nucleici e molecole della matrice quali il collagene, la laminina e la fibronectina. In termini di segnali fisici applicati alla rigenerazione tissutale del SNP, sono spesso coinvolti filamenti e fibre. Ad esempio, per consentire la rigenerazione nervosa in difetti maggiori di 3 cm del nervo peroneo di coniglio, sono stati utilizzati "luminal fillers" come le cellule di Schwann per promuovere una buona crescita anche su gap di 6 cm (Strauch, 2001; Zhang, 2002). Un recupero funzionale si osserva anche in difetti del nervo peroneo canino sino a 8 cm trattati con guide nervose in PGA-collagene riempite di fibre di collagene, e rivestite o impregnate di laminina prima dell'impianto

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

(Matsumoto, 2000). Tale rigenerazione dei nervi può riflettere il tipico scenario di fronte a lesioni umane del SNP e indica chiaramente l'importanza dei "luminal filler" nel migliorare la rigenerazione del SNP.

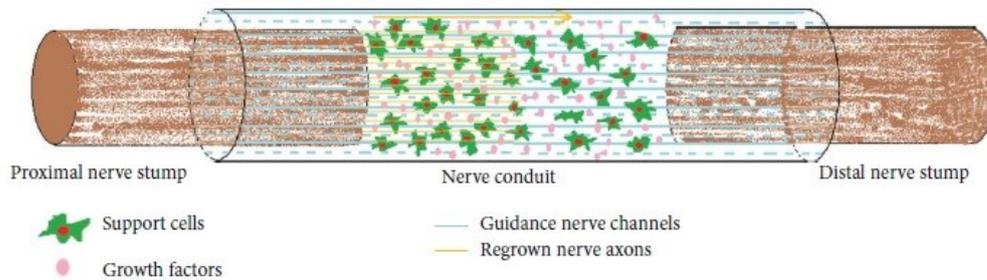


Fig 6. Microambiente ideale creato dalla guida neurale, Muheremu 2015

• FATTORI NEUROTROFICI

Numerosi studi hanno descritto il ruolo dei fattori neurotrofici nella sopravvivenza neuronale durante lo sviluppo embrio-fetale e durante la rigenerazione nervosa a seguito di una lesione. In condizioni fisiologiche, diverse cellule non-neuronali sintetizzano e secernono molti fattori trofici necessari per il mantenimento dell'omeostasi dei neuroni sani. Le cellule di Schwann e vari tessuti periferici (muscolo, cute, ecc.) presentano una produzione basale di fattori neurotrofici fondamentale per promuovere le normali funzioni dei neuroni sensitivi e motori. Dopo una lesione nervosa, nel moncone distale aumenta l'espressione dei fattori neurotrofici nel tentativo di sostenere la sopravvivenza e la crescita degli assoni rigeneranti e la reinnervazione dei tessuti denervati. I loro livelli ritornano normali a rigenerazione avvenuta, ma in caso di una denervazione cronica la produzione di fattori neurotrofici può protrarsi fino a 6 mesi dopo la lesione (Allodi, 2012).

Dal punto di vista teorico si possono distinguere due funzioni principali di questi fattori: una funzione neurotrofica vera e propria, cioè di preservazione del neurone dalla morte cellulare, e una funzione neurotropica, cioè di attrazione dell'assone rigenerante attraverso la creazione di un gradiente di concentrazione in modo tale da guidare la crescita nella giusta direzione. Dal punto di vista pratico, invece, risulta molto difficile distinguere fattori neurotrofici e fattori neurotropici, dal momento che la maggior parte delle molecole sembra svolgere entrambe le funzioni.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

In particolare, il fattore di crescita nervoso (NGF), la neurotrofina-3 (NT-3), il fattore neurotrofico derivato dalle linee cellulari gliali (GDNF) e i fattori di crescita dei fibroblasti (acidi e basici, aFGF e bFGF) sono tra le scelte più comuni.

- Il fattore di crescita neuronale (*nerve growth factor*, NGF).

Il fattore di crescita neuronale ha mostrato di migliorare la sopravvivenza dei neuroni e stimolare la rigenerazione nervosa (Huang e Reichardt, 2001). L'inclusione di soluzione salina con NGF nelle guide nervose in silicone può aumentare le dimensioni del nervo motore e la velocità di conduzione nei ratti dopo 6 settimane post-trattamento di una lesione del nervo sciatico con gap di 5 mm (He, 1992). Per prolungare la disponibilità di proteine neurotrofiche per i tessuti bersaglio, sono spesso utilizzati sistemi a rilascio controllato. Incapsulando l'NGF in microsfele è stato raggiunto il rilascio prolungato di NGF bioattivo per 20 giorni (Xu, 2003). Le potenzialità del sistema di rilascio delle proteine nel promuovere la rigenerazione del SNP è stata poi valutata utilizzando il nervo sciatico di un topo con lesione di 10 mm. Dopo 3 mesi, con l'utilizzo di condotti nervosi comprendenti soluzione salina con microsfele di NGF in sospensione sono state prodotte un maggior numero e una maggiore densità di fibre nervose rispetto ai gruppi di controllo dove sono state utilizzate guide nervose vuote e caricate con microsfele che contenevano una proteina non bioattiva, l'albumina sierica bovina (BSA). In uno studio separato, Lee et al. (2003) usarono eparina per immobilizzare l'NGF e controllare la sua diffusione da una matrice di fibrina. Il condotto nervoso, addizionato con 20 o 50 ng/ml di NGF, ha prodotto risultati simili rispetto ad un autotrapianto in un topo con lesione del nervo di 13 mm in termini di numero e diametro delle fibre nervose rigenerate. D'altra parte, NGC vuoti e NGC senza sistema di erogazione sono stati significativamente meno efficaci. Questi risultati indicano chiaramente la possibilità di includere l'NGF nel design delle guide nervose e la sua efficacia nella rigenerazione dei nervi e nel recupero funzionale del SNP.

- Neurotrofina-3 (NT-3).

NT-3 svolge un ruolo importante nel sostenere la sopravvivenza, la crescita e la differenziazione dei neuroni e nel favorire la formazione di sinapsi neuronali. Diversi studi hanno sviluppato e valutato l'efficacia degli NGC addizionati con NT-3 per la rigenerazione del SNP. Impregnando tappeti di fibronectina con NT-3 (500 ng/ml), i condotti nervosi bio-funzionalizzati

potrebbero essere innestati in un topo con gap del nervo sciatico di 10 mm per migliorare la rigenerazione del nervo (Sterne, 1997). In presenza di NT-3, al quindicesimo giorno la rigenerazione assonale era notevolmente aumentata rispetto al gruppo di controllo. Otto mesi dopo la chirurgia, anche se in entrambi i gruppi si è osservata la formazione di assoni di diametro simile, la presenza di NT-3 ha prodotto un numero di assoni mielinizzati significativamente maggiore. In uno studio separato, Midha et al. (2003) hanno utilizzato tubi porosi in PHEMA-MMA riempiti con matrice di collagene integrata sia con NT-3 (1 µg/ml), sia con il fattore neurotrofico brain-derived (BDNF 1 µg/ml) sia col fattore di crescita dei fibroblasti acido (FGF-1, 1 o 10 µg/ml) per colmare un gap di 10 mm nel nervo sciatico di ratto. La rigenerazione dei nervi, valutata a 8 settimane mediante analisi istomorfometrica, ha indicato l'efficacia di NT-3 nel migliorare la rigenerazione dei nervi, in misura simile a BDNF. Sebbene con le NT-3 i risultati siano stati inferiori a quelli di FGF-1, la presenza di NT-3 ha promosso rigenerazione tissutale in misura maggiore rispetto ai tubi vuoti e a quelli contenenti matrice di collagene.

- Fattore Neurotrofico derivato dalle Cellule Gliali (*glial cell-derived neurotrophic factor*, GDNF).

GDNF è un fattore neurotrofico secreto dalle cellule di Schwann dopo una lesione nervosa, noto per migliorare la sopravvivenza dei neuroni motori e sensitivi, lo sviluppo dei neuriti, la migrazione delle cellule di Schwann e, in particolare, la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici (Airaksinen e Saarna, 2002; Blesch e Tuszynski, 2003). L'inclusione di GDNF in NGC per promuovere il recupero dei nervi nel SNP è stata descritta da diversi autori. Guide nervose in Poli-etilene-co-vinil acetato (PEVA) addizionate con GDNF sono state utilizzate nella riparazione di un nervo facciale di ratto con gap di 8 mm. A 6 settimane post-innesto, il GDNF ha migliorato la formazione di assoni mielinizzati e motoneuroni rispetto all'inclusione di NT-3 o BSA (Barras, 2002). Con lo stesso metodo, Fine et al. (2002) ha dimostrato una maggiore rigenerazione dei nervi motore e sensoriali in un ratto con gap del nervo sciatico di 15 mm in presenza di GDNF rispetto all'inserimento di NGF e BSA a 7 settimane post-impianto. L'efficacia di GDNF nella rigenerazione del PNF è stata dimostrata anche da Chew et al. (2007). Utilizzando guide degradabili con GDNF incapsulato all'interno di fibre polimeriche ha dimostrato la rigenerazione nervosa e il recupero funzionale a 3 mesi post-impianto nei ratti con un gap di 15 mm, rispetto alle guide nervose senza

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

inclusione di GDNF. Allo stesso modo, utilizzando una pompa mini osmotica per il rilascio di proteine, Boyd e Gordon (2003) hanno fornito GDNF e BDNF al sito di lesione nel nervo tibiale di ratto. Mentre il GDNF non ha mostrato alcuna dose-dipendenza nel range testato (0,1- 10 µg/die), è stato chiaramente osservato un effetto sinergico con BDNF sul miglioramento della rigenerazione nervosa. Complessivamente, dagli studi comparativi effettuati finora, sembra che il GDNF sia un forte candidato per l'inclusione in modelli di NGC per migliorare la rigenerazione del SNP.

- Fattori di Crescita Fibroblastici (*Acid and basic fibroblast growth factor*, aFGF e bFGF).

I fattori di crescita dei fibroblasti stimolano la mitogenesi in una vasta gamma di cellule e migliorano la rigenerazione in seguito a lesione sia nei nervi periferici che nel midollo spinale. In un primo studio, l'inclusione di aFGF purificati in condotti nervosi riempiti di collagene ha aumentato la formazione di assoni mielinizzati, neuroni motori e sensoriali in ratti con gap del nervo sciatico di 5 mm rispetto al gruppo di controllo aFGF-free (Cordeiro, 1989). Utilizzando tubi porosi PHEMA-MMA riempiti con 10 µg/ml di aFGF dispersi in una matrice di collagene per colmare un gap di 10 mm nel nervo sciatico di ratto, Midha et al. (2003) hanno dimostrato la rigenerazione dei nervi 8 settimane dopo l'intervento chirurgico. La presenza di aFGF ha provocato una rigenerazione significativamente migliore rispetto agli altri gruppi sperimentali, che comprendevano guide PHEMA-MMA, guide riempite di gel di collagene, guide riempite con 1 µg/ml di NT-3 e guide riempite con 1 µg/ml di BDNF. Analogamente, l'efficacia di bFGF nel migliorare la rigenerazione dei nervi periferici è stata dimostrata da Wang et al. (2003). Un tubo poroso a doppio strato di poli-DL-lattide (PDLLA), semi-permeabile e biodegradabile contenente all'interno bFGF, è stato usato per riparare un gap di 15 mm nel nervo sciatico di ratto. A 4 mesi dall'impianto, è stato osservato un significativo miglioramento nella rigenerazione nervosa in presenza di bFGF. In ulteriori studi, Ohta et al. (2004) hanno anche sviluppato un sistema alternativo costituito da bFGF incorporato in idrogel di eparina/alginato. A 16 settimane post-chirurgia, questi idrogel con bFGF hanno mostrato una rigenerazione assonale più rapida, un diametro più largo delle fibre mieliniche e un miglior sviluppo della vascolarizzazione in un

gap di 10 mm nel nervo sciatico di ratto, rispetto al controllo trattato con gel alginato ordinario con bFGF.

- Altri fattori.

Un certo numero di altri fattori di crescita e neurotrofici, anche se meno comunemente usati nel SNP, si sono dimostrati efficaci nel migliorare la rigenerazione dei nervi periferici. Tali fattori comprendono il CNTF (*ciliary neuro-trophic factor*) (Zhang, 2004), il fattore di crescita gliale (GGF) (Mohanna, 2005), il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) (Hobson, 2002), il BDNF (Terris, 2001), il fattore inibitorio della leucemia (LIF) (Hart et al., 2003), il fattore di crescita insulino-simile (IGF-I) (Fansa, 2002) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) (Wells, 1997). In generale, queste proteine sono o iniettate direttamente nel lume dei condotti guida nervosi (Zhang, 2004) o incorporati all'interno di un idrogel (Hobson, 2002; Mohanna et al, 2003). Anche se la maggior parte degli studi finora non hanno analizzato nello specifico gli effetti del dosaggio di proteine sulla rigenerazione nervosa, queste hanno mostrato comunque una certa dose-dipendenza.

Con l'aumento della comprensione dei meccanismi coinvolti nella rigenerazione dei nervi periferici, i ricercatori hanno anche cercato di elaborare condotti nervosi più appropriati per imitare il naturale processo della secrezione di proteine durante la riparazione dei nervi in modo da migliorarne la rigenerazione. La combinazione di due o più fattori di crescita può offrire vantaggi aggiuntivi. Per esempio, le combinazioni di NGF e IGF-I hanno mostrato effetti sinergici sulla crescita dei neuriti (Jones, 2003). Complessivamente, gli studi che coinvolgono l'inclusione di fattori neurotrofici in NGC indicano chiaramente l'efficacia di questo approccio. È anche evidente che sia necessario comprendere in maniera più dettagliata la risposta alle dosi dei fattori neurotrofici e le loro combinazioni sulla rigenerazione nervosa per poter progettare lo scaffold ideale.

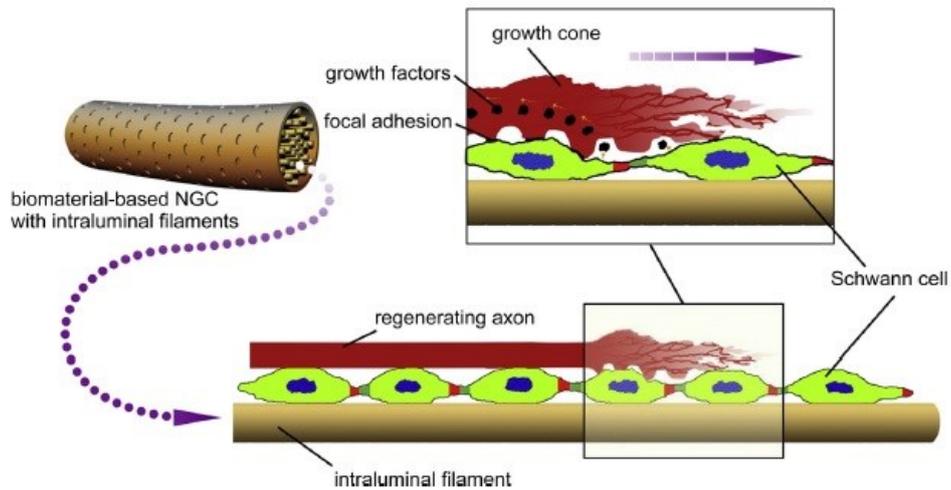


Fig 7. Rappresentazione schematica di come i luminal fillers supportino la migrazione delle cellule di Schwann e guidino la crescita assonale. Nel riquadro ingrandimento del particolare, da Gu (2014).

Table 1
Summary of biochemical factors incorporated into nerve guide conduits.

Biochemical factor	Loading amount or concentration	Conduit material	Animal model	Gap length	References
<i>Neurotrophic factors</i>					
NGF	i. 100 ng in PPE microspheres; 50 ng in saline solution	i. Silicone or PPE	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Xu et al., 2003)
	ii. 20–50 ng/ml with heparin-containing fibrin gel	ii. Silicone	ii. Rat sciatic nerve	13 mm	(Lee et al., 2003)
NT-3	i. 500 ng/ml NT-3 impregnated into fibronectin mats	i. Fibronectin mats	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Sterne et al., 1997)
GDNF	ii. 1 µg/ml in type I collagen gel	ii. PHEMA-MMA hydrogel	ii. Rat sciatic nerve	10 mm	(Midha et al., 2003)
	i. 1 wt.% in PEVA polymer rod	i. PEVA	i. Rat facial nerve	8 mm	(Barras et al., 2002)
	ii. 1 wt.% in PEVA polymer rod	ii. PEVA	ii. Rat sciatic nerve	15 mm	(Fine et al., 2002)
	iii. 0.13 wt.% in PCLEEP fibers	iii. PCLEEP	iii. Rat sciatic nerve	15 mm	(Chew et al., 2007)
aFGF bFGF	iv. 100 ng/ml with heparin-immobilized fibrin gel	iv. Silicone	iv. Rat sciatic nerve	13 mm	(Wood et al., 2009)
	i. 10 µg/ml in type I collagen hydrogel	i. PHEMA-MMA hydrogel	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Midha et al., 2003)
	i. 0.1 wt.% in PDLLA polymer solution	i. PDLLA	i. Rat sciatic nerve	15 mm	(Wang et al., 2003)
	i. 50 ng in heparin/alginate hydrogel	ii. Heparin/alginate hydrogel	ii. Rat sciatic nerve	10 mm	(Ohta et al., 2004)
CNTF GGF	i. 1 mg/kg in saline solution	i. Silicone	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Zhang et al., 2004)
	i. 1.25 µg/ml in 50:50 alginate-fibronectin hydrogel	i. PHB	i. Rabbit peroneal nerve	20–40 mm	(Mohanna et al., 2005)
VEGF LIF	i. 500–700 ng/ml in Matrigel	i. Silicone	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Hobson et al., 2000)
	i. 100 ng/ml in calcium alginate hydrogel	i. PHB	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Hart et al., 2003)
IGF-1	i. 100 ng/ml in DMEM delivered with osmotic pumps at 0.25 µl/h	i. Autologous nerve grafts or acellular ECM	i. Rat sciatic nerve	20 mm	(Fansa et al., 2002)
PDGF	i. 0.375 µg in laminin-containing Biomatrix, collagen, or methylcellulose gel	i. Silicone	i. Rat sciatic nerve	8 mm	(Wells et al., 1997)
<i>Cellular components</i>					
Schwann cells (syngeneic)	i. 1.25 × 10 ⁶ cells per conduit	i. PLGA	i. Rat sciatic nerve	20 mm	(Cheng and Chen, 2002)
Schwann cells (syngeneic, heterologous)	ii. 4 to 12 × 10 ⁷ cells/ml	ii. PAN/PVC copolymer	ii. Rat sciatic nerve	8 mm	(Guenard et al., 1992)
Schwann cells (syngeneic)	iii. 2 to 10 ⁶ × 10 ⁷ cells/ml	iii. PHB	iii. Rat sciatic nerve	10 mm	(Mosahebi et al., 2001)
Schwann cells (syngeneic)	iv. 2 × 10 ⁶ cells/ml	iv. Collagen (type I/III)	iv. Rat sciatic nerve	20 mm	(Stang et al., 2005)
Schwann cells (autologous)	v. 9.5 × 10 ⁶ cells/conduit	v. Silicone	v. Rat sciatic nerve	10 mm	(Nilsson et al., 2005)
Fibroblast-like MSCs	i. 1 × 10 ⁶ cells/conduit in 2% gelatin	i. Silicone	i. Rat sciatic nerve	15 mm	(Chen et al., 2007)
EMSCs	ii. 2 × 10 ⁶ cells/ml	ii. Autologous muscle conduits	ii. Rat sciatic nerve	20 mm	(Keilhoff et al., 2006a,b)
NSCs	i. 5 × 10 ⁶ cells/ml	i. Chitosan-coated PDMS	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Lin et al., 2008)
<i>ECM molecules</i>					
Collagen	i. Aligned collagen fibrils	i. Silicone	i. Rat sciatic nerve	5 mm	(Phillips et al., 2005)
	ii. Sponge like	ii. Collagen	ii. Rat sciatic nerve	20 mm	(Stang et al., 2005)
	i. Laminin-soaked collagen fibers	i. PGA	i. Canine peroneal nerve	80 mm	(Matsumoto et al., 2000)
Laminin	ii. Laminin-soaked collagen sponge	ii. PGA	ii. Canine peroneal nerve	80 mm	(Toba et al., 2001)
	iii. Laminin conjugated to 1% agarose gel	iii. Polysulfone	iii. Rat sciatic nerve	10 mm	(Yu and Bellamkonda, 2003)
	Fibronectin	i. Orientated fibronectin mats/hydrogels	i. Fibronectin mats	i. Rat sciatic nerve	10 mm
ii. Fibronectin conjugated to 2% alginate hydrogel		ii. PHB	ii. Rat sciatic nerve	10 mm	(Mosahebi et al., 2003)
Collagen, laminin, and FN	i. Collagen, laminin and fibronectin adsorbed to conduit lumen	i. Silicone	i. Rat sciatic nerve	10 mm	(Chen et al., 2000)

Legend: aFGF, fibroblast growth factor acidic; bFGF, fibroblast growth factor basic; CNTF, ciliary neurotrophic factor; EMSC, ectomesenchymal stem cells; GDNF, glial cell-line derived neurotrophic factor; GGF, glial growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor 1; LIF, leukemia inhibitory factor; MSC, mesenchymal stem cells; NGF, nerve growth factor; NSC, neural stem cell; NT-3, neurotrophin-3; PAN/PVC, poly(acrylonitrile-co-vinylchloride); PCLEEP, poly(ε-caprolactone-co-ethyl ethylene phosphate); PDGF, platelet-derived growth factor; PDLLA, poly(D,L-lactide); PDMS, polydimethylsiloxane; PEVA, poly(ethylene-co-vinyl acetate); PGA, polyglycolic acid or polyglycolide; PHB, polyhydroxy butyrate; PHEMA-MMA, poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate); PLA-TMC, poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate); PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); PPE, poly(phosphoester); VEGF, vascular endothelial growth factor.

Tab 3. Fattori Incorporati nei condotti neurali, da Jiang (2010).

● MATRICE EXTRACELLULARE E LE MOLECOLE DI ADESIONE

Anche le molecole espresse sulle superfici cellulari e nella matrice extracellulare (ECM) possono influenzare e guidare il processo di rigenerazione nervosa. Tali molecole vengono riconosciute dall'assone grazie ad appositi recettori di superficie e sembrano funzionare da veri e propri segnali direzionali per il movimento del cono di crescita.

Varie molecole di adesione, tra cui caderine, integrine e immunoglobuline permettono al neurone di entrare in contatto con componenti della ECM e con le cellule vicine. Le caderine permettono soprattutto l'adesione tra cellula e cellula. La principale caderina del sistema nervoso è la N-caderina che appare coinvolta non solo nel processo di crescita assonale, ma anche in

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

quelli di migrazione neuronale, crescita assonale e stabilizzazione dei contatti sinaptici (Ranscht, 2000).

Tra le molecole di adesione appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, la più studiata è N-CAM. Le Ig CAM permettono l'adesione intercellulare attraverso legami omofilici (immunoglobulina con immunoglobulina) contribuendo alla crescita del cono assonale, alla compartimentalizzazione in fascicoli degli assoni e al riconoscimento dell'organo bersaglio.

Infine le integrine sono una grande famiglia di recettori di superficie eterodimerici, composti da una subunità α e da una subunità β , che permettono un collegamento tra il citoscheletro e la matrice extracellulare. Per mezzo delle integrine il contatto con la ECM funziona come un segnale che viene trasmesso al citoscheletro, il quale risponde provocando il movimento del cono di crescita assonale, attraverso processi di assemblaggio e disassemblaggio dei microtubuli e dell'actina (Huber, 2003).

Le componenti della ECM che sembrano avere un ruolo maggiore nella rigenerazione nervosa sono laminina, fibronectina e il collagene.

Nel sistema nervoso la fibronectina è secreta dalle cellule di Schwann e dai fibroblasti. Questa glicoproteina forma una fitta rete fibrillare, interagisce con il collagene IV, la laminina e le integrine espresse sulle superfici cellulari, e inoltre promuove la proliferazione e la differenziazione cellulare. La fibronectina è rapidamente iperespressa a seguito di una lesione nervosa periferica.

La laminina è un'altra glicoproteina prodotta dalle cellule di Schwann a livello del sistema nervoso periferico. In particolare, dopo una lesione nervosa, si verifica un immediato aumento della laminina 8 che permane per circa 42 giorni, mentre l'incremento della laminina 2 si mantiene più a lungo. Anche il collagene in diversi studi si è dimostrato importante per i processi di crescita e guida assonale (Allodi, 2012).

COMPONENTI CELLULARI

Il trapianto di cellule e la sua integrazione in condotti nervosi sono strategie alternative al rilascio dei fattori neurotrofici, per creare un microambiente favorevole alla rigenerazione nervosa. Colture cellulari possono essere adattate a secernere un cocktail di fattori neurotrofici per migliorare ulteriormente la rigenerazione. Altri componenti cellulari possono supportare e guidare la rigenerazione dei nervi lesionati (Tohill e Terenghi, 2004).

- CELLULE DI SCHWANN.

Le cellule di Schwann svolgono un ruolo indispensabile nel sostenere la ricrescita degli assoni e la loro migrazione in seguito a lesioni del SNP. Queste cellule offrono un substrato preferenziale per la migrazione assonale, rilasciano fattori bioattivi e promuovono la formazione dei vasi sanguigni (Schlosshauer, 2003). In seguito al danno nervoso, le cellule di Schwann producono varie molecole della matrice extracellulare, come la laminina e il collagene, ed esprimono molte molecole e recettori di adesione cellulare, tra cui molecole di adesione cellulare neurale. Inoltre, dopo la degenerazione walleriana, le cellule di Schwann formano fibre orientate longitudinalmente (bande di Büngner) che servono come un binario guida per gli assoni in ricrescita (Lietz, 2006). Come risultato, essi sono di gran lunga i componenti cellulari d'elezione per il trapianto, con lo scopo di migliorare la rigenerazione del SNP. Tuttavia, al fine di garantire la sopravvivenza delle cellule di Schwann nel sito di lesione, è spesso richiesto un adeguato supporto strutturale. Gli idrogel in particolare sono comunemente usati come substrato di supporto per le cellule di Schwann nel lume degli NGC. Alginato/fibronectina (Mosahebi, 2003), gelatina (Hsu, 2004), collagene (Phillips, 2005) e Matrigel (Udina, 2004) sono tra le scelte più comuni.

Come osservato in diversi studi, la presenza di cellule di Schwann determina tipicamente una migliore rigenerazione nervosa e un miglior recupero funzionale. Tuttavia l'origine e la semina delle cellule di Schwann ha un impatto significativo sugli esiti della rigenerazione dei nervi.

Variando la densità di carico delle cellule tra 40 e 120 milioni di cellule per ml, è stata osservata una correlazione positiva tra il numero di assoni mielinizzati e la concentrazione di cellule di Schwann singeniche. Al contrario, le cellule di Schwann eterologhe hanno determinato forti reazioni

immunitarie e portato unicamente a una crescita limitata di assoni mielinizzati.

Mentre il miglioramento nella rigenerazione nervosa in presenza di cellule di Schwann è evidente nella maggior parte dei casi, è stato anche dimostrato che questo approccio è efficace solo quando il microambiente che circonda il sito della lesione è favorevole al tessuto di ricrescita.

Anche se è stata dimostrata la capacità di NGC contenenti cellule di Schwann di migliorare la rigenerazione dei nervi in modo più significativo rispetto a condotti privi di cellule, l'uso clinico delle cellule di Schwann pone diverse difficoltà pragmatiche la più grande delle quali è rappresentata dalla fonte di cellule di Schwann autologhe. Per ottenere un numero sufficiente di cellule vitali, sono spesso necessarie 3-10 settimane di espansione e purificazione *ex vivo*. Tali tentativi aumentano il costo e il rischio di contaminazione e, ancor più importante, determinano un ritardo tra il momento in cui si verifica la lesione e quello in cui può essere effettuata la riparazione, fatto che spesso conduce alla morte delle cellule nervose nel ganglio della radice dorsale, riducendo così il potenziale di recupero (Murakami, 2003). Per accorciare e facilitare il processo di estrazione e di espansione delle cellule di Schwann, Nilsson et al. (2005) hanno tentato un nuovo approccio. Rimuovendo 2-3 mm di nervo dalla estremità prossimale e distale del nervo reciso, si può ottenere un totale di 95.000 cellule (l'80% delle quali sono cellule di Schwann). Le cellule appena raccolte sono state poi immerse in un condotto nervoso in silicone per colmare un gap di 10 mm nel nervo sciatico di ratto. Sebbene il numero di SCs trapiantate fosse molto inferiore alla concentrazione cellulare ottimale come riportato da Mosahebi et al. (2001), i condotti che contenevano la sospensione cellulare hanno determinato una rigenerazione superiore rispetto alle guide nervose acellulari. Un altro metodo per arricchire la popolazione di cellule di Schwann è l'uso di cellule allogeniche. Purtroppo, tali approcci richiedono però la somministrazione sistematica di immunosoppressori (Udina, 2004).

- CELLULE OLFATTIVE (OEC).

Le OEC possono essere considerate come cellule nervose progenitrici poiché si sviluppano da una origine periferica, il placode olfattivo. OEC sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziarsi (Tohill e Terenghi, 2004), per promuovere la ricrescita assonale e la rimielinizzazione nel SNC e SNP in condizioni sperimentali (Wewetzer, 2002). Utilizzando tubi di silicone

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

riempiti con OEC, è stata osservata la rigenerazione assonale nel 50% dei ratti con gap del nervo sciatico di 15 mm e nel 79% degli animali con un gap di 12 mm (Verdu, 1999). Tali effetti terapeutici sono supportati anche da altri studi (Andrews e Stelzner, 2004; Dombrowski, 2006; Ramer, 2004). Tuttavia, il potenziale per il trapianto terapeutico di OEC in lesioni dei nervi periferici è ancora discutibile, in quanto vi sono molte difficoltà da superare nell'applicazione clinica, come ad esempio la fonte limitata autologa di OEC.

- LE CELLULE STAMINALI

Altri componenti cellulari come le cellule staminali embrionali (Lin, 2008), le cellule staminali neurali (Heine, 2004, Lin, 2008), i fibroblasti (Phillips, 2005), cellule staminali della pelle (Marchesi, 2007), le cellule staminali del follicolo pilifero (Amoh, 2005) e le cellule staminali ectomesenchimali (Nie, 2007) sono stati inclusi in NGC per promuovere la rigenerazione dei nervi. Anche se differiscono in termini di efficacia nella rigenerazione dei nervi, i loro effetti benefici, ad esempio sostenere la ricrescita degli assoni, la secrezione di fattori neurotrofici e molecole ECM possono contribuire ad un microambiente migliore per la rigenerazione dei nervi.

Fonti di cellule staminali

Secondo la fase di sviluppo, le cellule staminali possono essere divise in cellule staminali embrionali e cellule staminali adulte. Le cellule staminali possono essere caratterizzate in base al loro potenziale di differenziazione. Le cellule staminali totipotenti possono formare un intero embrione compresi i tessuti extraembrionali. Le cellule staminali pluripotenti possono innescare il mesoderma, l'endoderma e l'ectoderma.

Cellule postnatali o staminali adulte sono invece in grado di differenziarsi nelle cellule di un solo strato germinativo. Le cellule staminali unipotenti o progenitrici possono differenziarsi solo in un tipo di cellula definito.

Il potenziale di differenziazione delle cellule staminali può essere correlato al loro stadio di sviluppo e diminuisce da una cellula staminale embrionale a una cellula staminale di tessuti specializzati. Quelle completamente adulte e differenziate come le cellule somatiche non hanno naturalmente alcun potenziale di differenziazione. Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) sono un tipo di cellule staminali pluripotenti che possono essere generate

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

direttamente da cellule adulte. Thomson et al. hanno dimostrato che le cellule somatiche potrebbero essere trascrizionalmente regolamentate per esprimere un fenotipo più embrionale, creando in tal modo le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC).

Stem Cell by Source	Advantage	Disadvantages	Clinical or Preclinical Data	Mechanisms of Regenerative Benefit
Embryonic	Totipotent.	Regulatory restrictions. Ethical concerns. Risk of teratoma. Limited availability.	Ziegler et al. Cui et al.	Schwann Cells, GDNF, NGE, FGF, BDNF, angiopoietin-1. 35%-60% yield differentiation to Schwann cells
iPSC	Inducible from easily obtainable somatic cells.	Genetic manipulation required. Potential risk of teratoma.	Ikeda et al.	Differentiation to Schwann cells.
Adipose	Ease of harvest. Widely available.	Variability of results. Require stimulation for neurotrophic effect	Wei et al. He et al. Kingham et al. Sowa et al. Tomita et al.	Production of neurotrophic and angiogenic factors
Neural crest	Ease of harvest from skin and follicle cells. Can be induced from fibroblasts, hESC, iPSC.	-	Lin et al. Amoh et al. Grimoldi et al.	Differentiate into neurons and SC.
Bone marrow	Familiarity with harvesting.	Bone marrow biopsy required. Heterogeneity of cells.	Cuevas et al. Chen et al. Mohammadi et al. Fan et al.	Fibroblast-like cell differentiation. Increase production of myelin basic protein, NGE, BDNF, GDNF, CNTF

Tab 4. Fonti di cellule staminali, da Jones (2016).

Le cellule staminali embrionali (ESC: Embryonic Stem Cells)

Le ESC sono le cellule staminali pluripotenti derivate dallo stadio di blastocisti dello sviluppo embrionale. Le ESC possono differenziarsi in cellule somatiche di tutti i tre strati germinali embrionali. Con le ESC sono state impiegate diverse strategie nel settore delle lesioni dei nervi periferici.

Per sostituire le cellule di Schwann necessarie per la rigenerazione dei nervi, Ziegler et al. (2011) hanno sviluppato un protocollo per generare cellule di Schwann dalle ESC umane con una efficienza del 60%. Le cellule di Schwann differenziate sono state associate agli assoni. In un modello di lesione del nervo sciatico di ratto Cui et al. (2008) hanno raggiunto un significativo miglioramento della rigenerazione grazie alla microiniezione delle ESC neutro-indotte. L'immunocolorazione ha dimostrato che le ESC sono sopravvissute e si erano differenziate in cellule di Schwann. Una strategia alternativa è quella di iniettare ESC nel muscolo di destinazione al momento

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

dell'infortunio o di riparazione del nervo per evitare modifiche di denervazione muscolare e accelerare leggermente il recupero.

Le ESC sono interessanti anche per la generazione di linee di cellule staminali aggiuntive. Le linee di cellule staminali adulte in genere richiedono una procedura invasiva per la raccolta e possono essere limitate nella quantità ottenuta. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) possono essere generate da ESC e sono state utilizzate nei modelli animali pre-clinici.

Le ESC hanno un grande potenziale, ma non sono senza svantaggi; possiedono infatti potenziale per lo sviluppo del teratoma. In aggiunta, ci sono fonti limitate di embrioni umani da cui si ottengono ESC. Non trascurabile anche il dilemma etico rappresentato dall'utilizzo di un embrione umano che contiene il potenziale per formare un individuo completo a scopi di ricerca o per applicazioni cliniche.

Cellule staminali neurali (NSC: Neural Stem Cells)

NSC sono le cellule staminali in grado di differenziarsi in neuroni o cellule gliali. Esse sono presenti durante la neurogenesi per la corretta organizzazione del cervello e del midollo spinale. NSC sono state isolate dai modelli murini e fatte proliferare in vitro. Nel cervello umano adulto, le NSC risiedono nella zona subventricolare e nell'ippocampo. Si pensa che NSC adulte abbiano un ruolo limitato nelle lesioni del sistema nervoso centrale. Nel 1992, due gruppi di ricercatori hanno riportato l'isolamento con successo di NSCs dal tessuto cerebrale di topi adulti (Reynolds, 1992; Snyder, 1992).

Una varietà di studi hanno dimostrato che l'impianto di NSC è vantaggioso nelle lesioni del sistema periferico siano esse acute o croniche (Heine, 2004; Lee, 2016)

Tuttavia, NSC presentano alcuni inconvenienti e limitazioni. Studi condotti su modello animale murino hanno infatti messo in evidenza con l'utilizzo di tali cellule un alto tasso di formazione di neuroblastoma (Johnson, 2008).

Inoltre, nonostante le NSC siano state riscontrate in diverse aree del cervello, sono difficili da raccogliere. Inoltre, la differenziazione diretta delle linee di cellule neurali specializzate è difficile e gli attuali metodi sono efficaci solo in casi limitati (Zhang, 2008).

Le cellule staminali mesenchimali (MSC: Mesenchymal Stem Cells)

Anche se inizialmente sono state identificate come una popolazione di cellule multipotenti fibroblastiche nel midollo osseo diverse dalla linea

ematopoietica, le cellule staminali mesenchimali possono essere ottenute da una vasta gamma di fonti non-ossee. Le MSC sono state isolate dal tessuto adiposo, dal sangue periferico, dal liquido amniotico, dal cordone ombelicale, da tendini e legamenti, dal follicolo pilifero, da membrane sinoviali, dalla mucosa olfattiva, dalla polpa dentale e dal tessuto fetale. Le MSC sono di notevole interesse per la rigenerazione del tessuto dato il loro potenziale di differenziazione, la facilità di isolamento e la loro immunomodulazione. Sono intrinsecamente capaci di differenziarsi in tutti i lignaggi del mesoderma: grasso, ossa, muscoli e cartilagine. In ambiente adeguato, la differenziazione delle MSC può essere guidata in lignaggi non mesenchimali, come i neuroni, gli astrociti e le cellule di Schwann per sostenere la rigenerazione dei nervi. I sottotipi di cellule staminali mesenchimali e le loro relative applicazioni nelle lesioni del nervo periferico sono diverse:

I. Cellule staminali derivate dal midollo osseo (BMSC: Bone Marrow-Derived Stem Cells)

In condizioni adeguate BMSC possono differenziarsi in neuroni, astrociti e cellule SC-simili (Tohill, 2004).

Il destino delle BMSC può essere dettato dal microambiente fisiologico post-trapianto. Quasi il 5% delle BMSC sono state indotte a differenziarsi in cellule di Schwann all'interno del tessuto nervoso lesa 33 giorni dopo il trapianto (Cuevas, 2002).

Nijhuis et al. (2013) hanno dimostrato che BMSC impiantate all'interno di una vena di un muscolo auto-trapiantato hanno portato ad un aumento, all'inizio, del fattore di crescita dei nervi e delle cellule di Schwann.

Wang et al. hanno dimostrato in una lesione di 10 mm del nervo sciatico di coniglio un miglior recupero con BMSC sospese in una matrice rispetto all'utilizzo dell'innesto nervoso autologo. I conigli con BMSC sospese in matrice possedevano una velocità e un'ampiezza di conduzione dei nervi motori significativamente maggiori (Wang, 2015). È interessante notare che i benefici rigenerativi delle BMSC placcate su filamenti di poli-caprolattone erano superiori alle cellule di Schwann esogene placcate su filamenti in un modello murino (Carrier-Ruiz, 2015).

Raheja et al. hanno dimostrato che BMSC impiantate in un modello di ratto migliorano in modo dose-dipendente l'entità della mielinizzazione, lo spessore della mielina e lo spessore assonale (Raheja, 2012).

Non ci sono dati clinici riguardanti gli effetti benefici del trapianto di BMSC per la rigenerazione dei nervi, tuttavia, è già stato clinicamente utilizzato per

il trattamento di infarto del miocardio e lesioni del midollo spinale (Hu,, 2015; Rodrigo, 2014; Kumar, 2009).

Anche se le BMSC presenti sono più facilmente prelevabili rispetto alle ESC e alle NSC, le loro capacità di proliferazione e differenziazione sono inferiori. Inoltre, l'utilizzo delle BMSC è limitato dalla necessità di una procedura invasiva per la loro raccolta. Le procedure di recupero sono invasive e dolorose, di solito richiedono l'utilizzo di anestesia, mentre la frazione di cellule staminali ottenute è ovviamente inferiore a quella ottenibile da altre fonti.

II. Cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ADSC- Adipose-Derived Stem Cells)

Le ADSC possono derivare da tessuto adiposo ottenuto da procedure comuni come la liposuzione. Queste cellule sono particolarmente vantaggiose poiché sono disponibili tramite raccolta mininvasiva con un alto rendimento cellulare di $(0,25-0,375) \times 10^6$ cellule per millilitro di grasso liquido dopo 4 e fino a 6 giorni di crescita in coltura con terreno contenente un 10% di siero fetale bovino (Gimble, 2013).

Esse mostrano una proliferazione superiore e un maggior potenziale di differenziazione rispetto alle BMSC (Strem, 2005).

Le ADSC possono differenziarsi in un fenotipo SC-like (differenziate da cellule staminali derivate da tessuto adiposo, DASC) che condivide le proprietà morfologiche e funzionali delle SC, rappresentando quindi una valida alternativa a queste. Diversi studi hanno indicato che non ci fosse differenza significativa per la rigenerazione del nervo sciatico utilizzando DASCs a 2 o 14 giorni. Liu et al. hanno tagliato il nervo sciatico di ratto in frammenti di 1 cm per poi immergerli in un mezzo di coltura che stimolasse la differenziazione per due giorni. Le ADSC di ratto differenziate sono simili alle cellule di Schwann originali dopo essere state incubate con mezzo di induzione per cinque giorni. La stragrande maggioranza degli studi ha dimostrato un aumento sulla rigenerazione dei nervi periferici tramite l'utilizzo di ADSC seminate in condotti in silicone (Suganuma, 2013; Klein, 2016).

In particolare, il trapianto di ADSC riduce l'atrofia muscolare, facilita una disposizione ordinata degli assoni e la mielinizzazione e riduce l'infiammazione. Alcuni ricercatori sostengono che le ADSC possiedono un effetto terapeutico simile a quello di SC e BMSC autologhe. Anziché differenziare le SC, si ipotizza che le ADSC possano facilitare prevalentemente il reclutamento endogeno di SC rilasciando fattori di

crescita come NGF, fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), e il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) per la protezione dei nervi e la rigenerazione e che l'effetto terapeutico venga mantenuto per diverse settimane. Le ADSC possono essere di aiuto sia all'angiogenesi sia alla differenziazione diretta nell'endotelio vascolare con i loro effetti paracrini associati. Come le BMSC, il potenziale neurotrofico delle ADSC è influenzato dal luogo di raccolta, (Engels, 2013) dallo strato di grasso (Trempp, 2015) e dall'età del donatore (Sowa, 2012).

Altro grosso limite è il potenziale di differenziamento verso gli adipociti, che è ovviamente sfavorevole per la rigenerazione del nervo (Faroni, 2016).

Cellule staminali feto derivate

I tessuti fetali sono la fonte più primitiva di cellule staminali mesenchimali e sono quelle che hanno ricevuto meno danni genetici causati da età, ambiente e malattia (Fairbairn, 2014).

Le cellule staminali possono essere ottenute da fonti multiple, come il liquido amniotico, la membrana amniotica, il cordone ombelicale, e la gelatina di Wharton. Poiché tali tessuti sono generalmente abbandonati dopo la nascita, le cellule staminali embrionali derivate sono in eccesso e sufficienti e quindi possono essere facilmente ottenute senza la necessità di dover ricorrere a procedure invasive. Le cellule ottenute possono proliferare in coltura e differenziarsi in un fenotipo neurale (Fu, 2006).

1. Cellule staminali derivate dal tessuto amniotico (ATDSC: Amniotic Tissue-Derived Stem Cells)

Le ATDSC derivano dal liquido amniotico o dalla membrana amniotica e possiedono caratteristiche sia dei tessuti mesenchimali sia delle cellule staminali neurali e possiedono la capacità di differenziarsi in tessuto neurale (Tsai, 2004; 2006)

Esse mostrano anche un forte potenziale angiogenico: infatti col loro impianto aumenta la perfusione e si verifica una maggiore vascolarizzazione intraneurale oltre che una promozione della rigenerazione dei nervi periferici. La sopravvivenza delle ATDSC successivamente al trapianto rappresenta la sfida alla loro applicazione clinica. La modificazione genetica e l'inibizione di mediatori infiammatori possono frenare la cascata apoptotica. Diversi rapporti hanno esplorato l'effetto di una mutazione genetica nella ATDSC sulle lesioni del nervo periferico. ATDSC umane con una modifica GDNF sono in grado di migliorare in modo significativo la redditività, la rigenerazione e la funzione motoria nei modelli animali (Cheng, 2010).

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

Il fattore 1 α derivato dalle cellule-stromali (SDF-1 α : Stromal cell-derived factor-1 α) è espresso in muscoli e nervi dopo la lesione nervosa periferica e può reclutare ATDSC per la loro deposizione; quindi nel tempo, l'iniezione di SDF-1 α ad alti livelli aumenta efficacemente il numero di ATDSC nel sito di riparazione, promuovendo la rigenerazione dei nervi (Yang, 2012).

2. MSC derivate dal cordone ombelicale (UC-MSC: Umbilical Cord-Derived MSCs)

Le UC-MSC rappresentano un candidato promettente per le terapie cellulari grazie al loro potenziale di differenziazione e proliferazione. Esse sono facilmente reperibili dal tessuto postnatale che viene scartato dopo la nascita richiedendo così un minor numero di problemi etici. Anche se le UC-MSC hanno capacità proliferative, esistono alcune segnalazioni circa la possibile influenza sulla genesi tumorale in studi sui trapianti (Bongso, 2008). Matsuse et al. hanno segnalato un sistema per indurre le UC-CSM a differenziarsi in cellule con proprietà delle SC utilizzando β -mercaptoetanololo seguito da acido retinoico e un insieme di specifiche citochine (Matsuse, 2010). Ulteriori studi hanno rivelato che le cellule di Schwann differenziate a partire da UC-MSC hanno portato alla produzione di fattori neurotrofici come il NGF e il BDNF. Inoltre, cellule umane differenziate Schwann-simili trapiantate in topi con lesione del nervo sciatico, sotto immunosoppressione, hanno mantenuto il fenotipo differenziato, stimolato la rigenerazione assonale dal segmento prossimale e formato tessuto nervoso periferico. Questo è stato funzionalmente equivalente a SC autentiche (Zarbakhsh, 2016).

Ciò indica che le UC-MSC potrebbero essere utilizzate per generare alternativamente cellule di Schwann nella terapia rigenerativa per lesioni del nervo periferico.

3. Gelatina di Wharton MSC (WJMSCs: Wharton's Jelly MSCs)

La gelatina di Wharton è uno speciale tessuto connettivo primitivo che protegge i vasi nel cordone ombelicale (Raio, 1999).

Le cellule per loro specifiche caratteristiche mesenchimali in questo particolare distretto sono chiamate gelatina di Wharton MSC (WJMSC) (Wang, 2008).

Le WJMSC hanno dimostrato la capacità di differenziarsi in cellule di Schwann-simili. Inoltre, possono generare fattori neurotrofici compreso NGF, BDNF e neurotrofina-3 (NT-3), e innescare la crescita assonale in vitro (Peng, 2011).

Così, la gelatina di Wharton può diventare una fonte ideale di cellule staminali mesenchimali, unica e facilmente accessibile.

Il tessuto fetale offre una alternativa futura per l'acquisizione di cellule staminali. I principali ostacoli della loro applicazione sono dati dall'alloreattività e dall'immunoreattività, che non si possono incontrare nelle cellule staminali provenienti da altre fonti. La banca di cellule per lo stoccaggio di prodotti fetali offre una risoluzione per questo problema.

Cellule staminali Pelle-derivate (SKP-SC: Skin-Derived Precursor Stem Cells)

Le SKP-SCS si trovano nel derma e sono una fonte disponibile per le cellule somatiche multipotenti. Oltre alla capacità proliferativa durevole, le SKP-SC possono differenziarsi in una gamma diversificata di tipi di cellule, tra cui melanociti, cartilagine cranio-facciale, osso, tessuto connettivo, muscolatura liscia vascolare, cellule endocrine, neuroni e cellule gliali (Biernaskie, 2006).

Le SKP-SCS coltivate in neuregulina-1 β esprimono gli stessi marker delle SC (McKenzie, 2006).

Inoltre, sia indifferenziate che differenziate, le SKP-SCS hanno portato all'accelerazione della rigenerazione dei nervi. Il trattamento con SKP-SC aumenta in modo significativo la conta degli assoni e riduce la percentuale di detriti di mielina (Khuong, 2014).

Diversi studi hanno dimostrato outcomes superiori utilizzando le SKP-SC sulla demielinizzazione e sulle lesioni da schiacciamento e anche sulle lesioni da resezione acuta e cronica (Grimoldi, 2015).

Cellule staminali del follicolo pilifero (HFSCs: Hair Follicle Stem Cells)

Le cellule staminali del follicolo dei capelli sono derivate embriologicamente dalla cresta neurale e sono una fonte abbondante e accessibile di cellule staminali pluripotenti (Joannides, 2004).

HFSC vengono espansi facilmente in coltura, ma non possono essere conservate per lunghi periodi, il che è simile a ciò che accade per le SKP-SC. I fattori di trascrizione per le ESC, come Nanog, Oct4, e Nestin sono espressi positivamente nelle HFSC. Inoltre, anche le HFSC possono differenziarsi in una varietà di tipi di cellule, come adipociti, cellule muscolari lisce, melanociti, neuroni e cellule gliali (Yu, 2010).

Uno dei vantaggi delle HFSC è che possono differenziarsi in una popolazione SC umana pura rapidamente e in maniera semplice, senza la necessità di manipolazione genetica. Le HFSC indifferenziate utilizzate in un modello murino con lesioni da schiacciamento e da resezione dei nervi sciatico e

tibiale hanno dimostrato un significativo miglioramento della funzionalità (Amoh, 2012).

Il miglioramento dei risultati con gap di 4 cm del nervo sciatico di ratto sono stati visti con l'aggiunta di neuroni e cellule di Schwann derivate da HFSC ad uno xenotrapianto acellulare (Lin, 2009).

Cellule staminali della polpa dentaria (DPSCs: Dental Pulp Stem Cells)

La nuova formazione di dentina e la produzione odontoplastica in risposta a gravi danni del dente ha suggerito l'esistenza di cellule staminali mesenchimali nel tessuto della polpa dentaria. Esse mostrano tra le altre, la caratteristica delle cellule staminali mesenchimali che possono evolvere verso differenti tipi cellulari comprese le cellule neurali anche se solo in particolari condizioni di coltura. In particolare, le DPSC possono esprimere marcatori neurali, generare fattori neurotrofici, promuovere la guida degli assoni e differenziarsi in neuroni funzionalmente attivi (Askari, 2015).

Anche se i dati disponibili sono limitati, le DPSC hanno dimostrato di chemoattrarre assoni del ganglio trigeminale, differenziarsi in SC o nutrire SC a supporto delle radici dorsali dei gangli favorendo la crescita dei neuriti, e guidare la riparazione della mielina (Martens, 2014; Yamamoto, 2016).

Le DPSC secernono vari fattori trofici che aumentano la rigenerazione dei nervi periferici. Inoltre, le DPSC sono segnalate per avere una proliferazione più forte, un maggiore potenziale clonogenico e una popolazione di cellule staminali/progenitrici più grande rispetto alle BMSC, suggerendo così la loro applicabilità clinica (Alge, 2010).

Inoltre, sono state segnalate migliorare la loro funzione tramite la combinazione con un campo elettromagnetico pulsato sotto forma di cellule SC-simili (Hei, 2016).

In modo simile al tessuto fetale, le cellule autologhe possono essere facilmente raccolte, ma richiedono uno stoccaggio. Dovrebbero pertanto essere considerate banche di cellule per le loro proprietà di facile isolamento e crioconservazione.

Cellule staminali progenitrici muscolo-derivate (MDSPC: Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells)

Le MDSPC possono essere derivate dal muscolo scheletrico e avere sostenuto un auto-rinnovamento, la proliferazione a lungo termine e la

differenziazione a cellule multipotenti (Deasy, 2005). Anche se le MDSPC hanno dimostrato il potenziale per la rigenerazione dei muscoli scheletrici e cardiaci, ossa e cartilagine articolare, la ricerca sul loro ruolo nella riparazione dei nervi è limitata nell'uomo. Alcuni ricercatori hanno riferito che il trapianto con MDSPC potrebbe essere applicato alla neuropatia in quanto possono differenziarsi in cellule SC, in cellule perineurali/endoneurali, cellule endoteliali vascolari e periciti necessari per la rigenerazione neurovascolare. Un danno al nervo periferico spesso si accompagna a traumi muscolo-scheletrici. Le MDPC dal tessuto muscolare traumatizzato secernono fattori neurotrofici che sono associati con il tessuto muscolare reinnervato. Le MDSPC rappresentano un'opportunità nella rigenerazione dei nervi periferici insieme alla prevenzione dell'atrofia muscolare; prove limitate e un sito di raccolta adeguato sono sfide ancora in fase di sviluppo.

Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs: Induced Pluripotential Stem Cells)

Considerando le limitazioni dei vari tipi di cellule staminali, i ricercatori hanno cercato di produrre artificialmente le cellule staminali. Takahashi ha messo a punto un protocollo di fattori di trascrizione definiti per indurre pluripotenza in fibroblasti di topo e umani (Takahashi, 2006).

La capacità delle cellule riprogrammate fornisce una nuova speranza di riuscire a sviluppare una cellula staminale pluripotente individuale specifica in grado di superare i limiti delle CES. Allo stato attuale, la comprensione delle iPSC è avanzata in molteplici meccanismi patologici e sono utilizzate per lo screening in vitro di droghe e per la valutazione dell'efficacia terapeutica. Oltre alla differenziazione in cellule somatiche, è stato stabilito il metodo per indurre la differenziazione delle iPSC lungo linee neurali. A dispetto dell'efficienza e di una maggiore variabilità nel corso del processo di differenziazione, le iPSC hanno presentato in modelli animali un potenziale rigenerativo sia per lesioni nervose centrali che periferiche.

Le iPSC sono state utilizzate per indurre neurosfere in coltura 3-D per il mantenimento della capacità di formazione di cellule neuronali o gliali. Le iPSC sono state applicate per rivestire un condotto nervoso bioassorbibile tissutale e impiantato poi a topi con lesione nervosa periferica. La rigenerazione assonale e la mielinizzazione sono stati migliori senza riscontrare la formazione di teratoma in un follow-up di 48 settimane, il che

suggerisce la loro potenziale applicazione alternativa nelle lesioni del sistema periferico.

Anche se le iPSC sono favorevoli dato che evitano le questioni etiche e la necessità di immunosoppressione, esiste ancora per queste cellule la memoria epigenetica dalle cellule somatiche originali, le aberrazioni cromosomiche e l'oncogenicità.

Il confronto di cellule staminali provenienti da diverse risorse è riassunto nella tabella 5.

Per l'applicazione clinica di trapianto di cellule staminali, la fonte ideale dovrebbe essere personalizzata, immunotollerante, facile da raccogliere, non oncogenica, in grado di essere integrata nel tessuto nervoso dell'ospite e chiaramente efficiente.



Fig 8. Meccanismi delle cellule staminali nella rigenerazione nervosa periferica. Da Jiang (2016), modificata

Stem Cell	Classification	Advantage	Disadvantage	Preclinical or Clinical Use	Mechanism
ESCs	Pluripotent stem cells	Homogenous, no detrimental impact of age and disease, unlimited cell number, better differentiation potential, and longer lasting proliferation capacity	Teratoma formation, ethical dilemma	Preclinical	Myelination and/or neurotrophic factors
NSCs	Multipotent stem cells		Difficult to be harvested	Preclinical	Replace Schwann cells
BMSCs	Multipotent cells	Easily accessible without ethical concerns	Lower capacity of proliferation and differentiation, invasive procedure for autologous harvesting	Preclinical	Myelination, neurotrophic factors
ADSCs	Multipotent stem cells	Easy to harvest, higher proportion and superior proliferation	Differentiation potential towards adipocytes	Preclinical	Myelination, neurotrophic factors, reduce inflammation
Fetal-derived stem cell	Multipotent stem cells	Less immunoreactivity	Cell bank for storage	Preclinical	Augmented blood perfusion and enhanced intraneural vascularity
SKP-SCs	Multipotent cells	Easy to harvest	Long time to differentiate	Preclinical	Replace Schwann cell myelination
HFSCs	Multipotent stem cells	Abundant and accessible source, differentiate into pure human SC population	Difficult to isolate	Preclinical	Replace Schwann cell myelination, neurotrophic factors
DPSCs	Multipotent stem cells	Stronger harvesting and proliferation potential, as well as greater clonogenic potential	Require storage	Preclinical	Replace Schwann cell myelination, neurotrophic factors
MDSPCs	Progenitor cells	Abundant and accessible source	Limited research	Preclinical	Neurotrophic factors
iPSCs	Pluripotent stem cells	Inducible from easily obtainable somatic cells	Subdued efficiency and enhanced variability during the differentiation process, epigenetic memory from the original somatic cells, chromosomal aberrations, stronger tumorigenicity	Preclinical	Replace Schwann cell myelination, neurotrophic factors

Tab 5 Comparazione delle cellule staminali nel meccanismo di rigenerazione del SNP, da Jiang (2016).

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

CAPITOLO 2

2.1 ANATOMIA MACROSCOPICA DEL PLESSO BRACHIALE

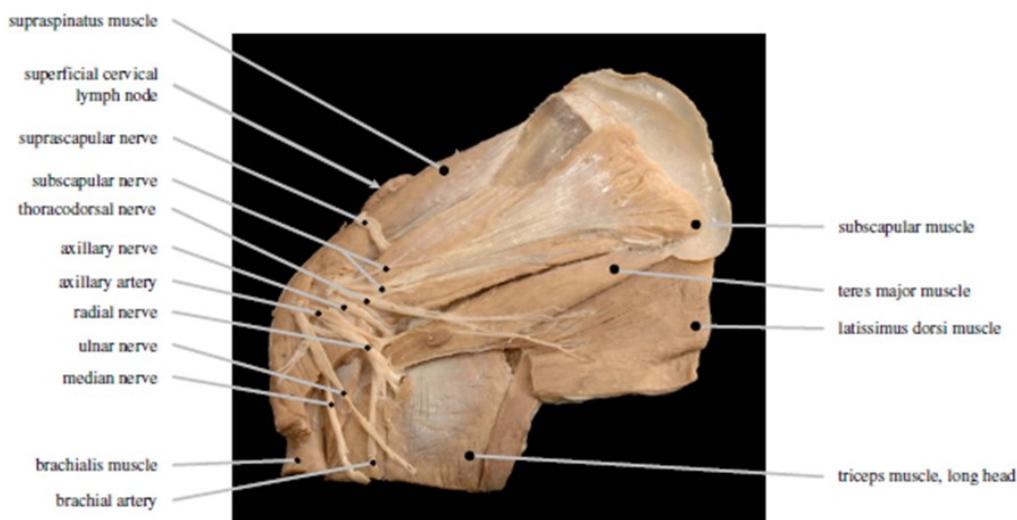


Fig. 9. Plesso brachiale ovino.

Il plesso brachiale (*Plexus brachialis*) è un complesso formato dalla convergenza dei rami ventrali degli ultimi nervi cervicali e del primo o dei primi due nervi toracici, da cui prendono origine, dopo scambio e riorganizzazione dei loro fasci, i nervi dell'arto toracico.

Situato nello spazio ascellare, tra i muscoli scaleni e la spalla, immerso in abbondante connettivo e sottoposto a grandi spostamenti, esso presenta una conformazione che si è adattata ad ogni uso specifico dell'arto toracico.

COSTITUZIONE

Si denominano **radici del plesso** (Radices Plexus) gli apporti forniti a quest'ultimo dai rami ventrali dei nervi cervicali e toracici. Il loro rispettivo volume non è uniforme. I grossi rami ventrali dei due ultimi nervi cervicali e del primo nervo toracico si portano al plesso totalmente, ad eccezione di

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

sottili filuzzi destinati al muscolo lungo del collo e dell'esilissimo primo nervo intercostale proveniente dal primo nervo toracico. La partecipazione di C6, pur essendo costante, varia a seconda della specie: è assai consistente nell'uomo, ancora notevole nei Carnivori e nel Coniglio, mentre è più ridotta negli Ungulati. La partecipazione di C5 è la regola soltanto nell'Uomo, nel Maiale e nel Coniglio, mentre è incostante nei Carnivori ed è inusuale negli Equidi e nei Ruminanti. La partecipazione di C4, incostante e sempre modesta, avviene soltanto nell'Uomo e nel Coniglio.

Prima di considerare il plesso propriamente detto, si deve considerare che alcune delle sue radici si uniscono con quelle a loro vicine per formare i **tronchi del plesso** (*Trunci plexus*) che si riuniscono in maniera costante a seconda della specie. Come regola generale, si trovano due tronchi: uno è craniale, formato dalla radice ventrale di C7 (C6 nell'Uomo) rinforzato da contributi più esili e più lunghi del o dei nervi che precedono; un altro tronco è caudale, formato dal grosso ramo ventrale di T1 (C8 e T1 nell'Uomo), eventualmente rinforzato da T2; infine un tronco intermedio è fornito da C8 nei mammiferi domestici e da C7 nell'uomo. Ogni tronco apporta di regola le fibre destinate ad uno o più determinati nervi.

Quando l'arto è libero, unito al torace soltanto dalla sua cintura, come nei Primati, i tronchi si scambiano numerosi fasci che però rimangono distinti. Le loro branche si dispongono allora su due piani, uno laterale da cui derivano i nervi preposti all'abduzione e all'estensione dell'arto e l'altro, mediale, che fornisce i nervi per l'adduzione e la flessione. Al contrario, quando il braccio è mantenuto a ridosso del torace e presenta rispetto a questo soltanto spostamenti in un piano sagittale, come negli Ungulati, i tronchi sono corti, subito uniti in una lamina più o meno ispessita, i cui nervi vengono tuttavia emessi nello stesso ordine.

RAPPORTI E DISTRIBUZIONE

Le radici cervicali del plesso, situate dapprima tra i muscoli lungo del collo e scaleno, convergono in direzione ventrocaudale e meno laterale nei Mammiferi Domestici che nell'Uomo. La radice formata dal primo nervo toracico, rinforzata eccezionalmente da un modestissimo apporto di T2, incrocia il collo della prima costa e raggiunge sul margine craniale di quest'osso la radice proveniente dall'ultimo nervo cervicale. L'insieme passa

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

tra i muscoli scaleni ventrale e medio negli Ungulati e nell'Uomo, ventralmente a questi muscoli nei Carnivori.

Cranialmente alla prima costa, il plesso raggiunge l'origine dei vasi ascellari con i quali i suoi rapporti variano a seconda della specie. In tutti i Mammiferi Domestici questi vasi passano ventralmente ai muscoli scaleni. Sono quindi in rapporto diretto con i tronchi o le branche del plesso nei Carnivori e nel coniglio, mentre negli Ungulati e nell'Uomo sono separati da queste formazioni ad opera del muscolo scaleno ventrale. L'arteria, assieme alle radici del plesso decorre tra i muscoli scaleni medio e ventrale, mentre la vena passa ventralmente a quest'ultimo muscolo. In ogni caso a questo livello il plesso copre lateralmente i vasi. L'insieme, immerso in abbondante connettivo, è coperto dai muscoli omotrasversario, sopraspinoso, eventualmente (Cavallo, Maiale, Coniglio) succlavio e, infine dal muscolo cleidocefalico come pure dalla clavicola nell'Uomo.

A partire da questo livello, il plesso emette le sue prime branche che si distribuiscono alla parete del torace e alla spalla. I nervi destinati all'arto toracico, meno numerosi ma più grossi, accompagnano i vasi per passare con essi nella fessura che la fascia ascellare presenta sul margine dorsale dell'inserzione omerale del muscolo pettorale ascendente e raggiungere così l'arto stesso.

Conservando soltanto in parte l'ordine topografico, i nervi del plesso brachiale vengono suddivisi in:

- A- Nervi destinati alla parete toracica
- B- Nervi destinati all'arto toracico che controllano abduzione ed estensione
- C- Nervi destinati all'arto toracico che controllano l'adduzione e la flessione.

A- NERVI DESTINATI ALLA PARETE TORACICA

I nervi che originano dal plesso destinati alla parete toracica sono i nervi dorsale della scapola, succlavio, pettorali craniali, toracico lungo, toracodorsale, toracico laterale e pettorali caudali.

- Nervo Dorsale della scapola (*Nervus dorsalis scapulae*): ignorato da molti autori, nasce dal ramo ventrale di C6 (C5 nel Maiale e nell'Uomo) in prossimità dell'uscita di questo ramo dal foro intervertebrale e si porta in direzione dorso caudale sulla superficie del muscolo dentato

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

- del collo nel quale penetra subito dopo. I suoi rami terminali si esauriscono nel muscolo romboide.
- Nervo Succlavio (*Nervus subclavius*): si distribuisce al muscolo omonimo. Riceve le sue fibre da C6 e da C7. Vestigiale nei Ruminanti.
 - Nervi Pettorali Craniali (*Nervi pectorales craniales*): le loro fibre provengono da C7, C6 e perfino C8 e passano nella parte iniziale dei nervi muscolo cutaneo e mediano a ciascuno dei quali forniscono una radice (negli Ungulati tramite l'ansa Ascellare) ventralmente all'arteria ascellare. Il o i nervi passano tra i muscoli pettorale ascendente e succlavio, (sulla faccia laterale del muscolo pettorale ascendente nei carnivori, nei quali manca il muscolo succlavio, e nei Ruminanti che ne presentano solo un rudimento). Raggiungono così la faccia profonda del muscolo pettorale trasverso al quale si distribuiscono dopo aver fornito uno o più rami al muscolo pettorale discendente.
 - Nervo Toracico Lungo (*Nervus thoracicus longus*): Si distribuisce soltanto al Muscolo Dentato ventrale del torace. Proviene soprattutto dal settimo nervo cervicale. Largo e nastriforme si porta in direzione caudale incrociando la superficie della parte dorsale del plesso brachiale per raggiungere quella del muscolo dentato ventrale del torace. Si continua incrociando a metà la direzione delle fibre di questo muscolo e vi termina mediante una serie di rami, dorsali e ventrali distribuiti abbastanza regolarmente. Nei Ruminanti è particolarmente largo.
 - Nervo Toracodorsale (*Nervus thoracodorsalis*): si distribuisce soltanto al muscolo grande dorsale. Il suo nome sottolinea la stretta relazione con l'Arteria Toracodorsale. Proviene principalmente dal ramo ventrale di C8. Di notevole diametro, si porta in direzione dorso-caudale raggiungendo il muscolo grande dorsale a cui distribuisce i suoi rami.
 - Nervo Toracico Laterale (*Nervus thoracicus lateralis*): grosso nervo che proviene dai rami ventrali di C8 e T1. Si stacca dalla parte caudale del plesso brachiale, incrocia la faccia mediale dei muscoli grande rotondo e grande dorsale, allontanandosi dal nervo toracodorsale, per ramificarsi caudalmente al muscolo grande dorsale formando un ampio ventaglio sulla faccia profonda del muscolo cutaneo del tronco. Queste divisioni si mescolano coi rami perforanti dei nervi intercostali

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

e le più ventrali vanno insieme a queste ultime ad innervare la pelle dell'addome. Negli Ungulati il nervo toracico laterale invia, nel passare dietro al braccio, un ramo che va a rinforzare il nervo cutaneo laterale craniale del braccio partecipando così all'innervazione cutanea della faccia laterale del braccio. Manca nell'Uomo che è sprovvisto del muscolo cutaneo del tronco.

- Nervi Pettorali Caudali (*Nervi pectorales caudales*): si staccano dalla parte iniziale del nervo toracico laterale e si portano in direzione ventre caudale per raggiungere la faccia profonda del muscolo pettorale ascendente a cui forniscono l'innervazione.

B- NERVI DESTINATI ALL'ARTO TORACICO CHE CONTROLLANO L'ABDUZIONE E L'ESTENSIONE

Sono i nervi soprascapolare, ascellare e radiale.

- Nervo soprascapolare (*Nervus suprascapularis*): nasce dalla parte craniale del plesso brachiale e riceve le sue fibre principalmente da C6 e in via accessoria perfino da C7 (anche da C5 nell'Uomo). Relativamente grosso, si dirige ventrocaudalmente per raggiungere i vasi soprascapolari della parte distale dell'interstizio compreso tra i muscoli soprascapolare e sottoscapolare. Raggiunge tramite questo spazio il margine craniale della scapola, di cui contorna la faccia laterale per arrivare sulla faccia profonda del muscolo infrascapolare nel quale terminano le sue divisioni, fornendo fibre nel suo tragitto al muscolo sovraspinato e alla capsula dell'articolazione scapolo omerale. Assicura l'innervazione motoria a questi muscoli (infrascapolare e sovraspinato) e in via accessoria la sensibilità propriocettiva. Il rapporto col collo della scapola lo espone a stiramenti in caso di abduzione violenta dell'arto o allo schiacciamento nel caso di una forte e duratura pressione sulla regione. La sua paralisi assume aspetti caratteristici. A breve termine, non essendo più sostenuta lateralmente, la spalla sembra staccarsi dal torace ogni volta che l'arto si appoggia prima di essere riposizionato dai muscoli sottoscapolari e pettorali. Con il passare del tempo, l'atrofia dei muscoli soprascapolare ed infrascapolare conferisce alla spalla un aspetto scarnificato poiché la spina scapolare diventa sporgente sotto la pelle.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

Nei ruminanti non presenta particolarità peculiari, tuttavia un piccolo ramo destinato al margine craniale del muscolo sottoscapolare origina in comune con esso.

- **Nervo Ascellare (*Nervus axillaris*):** è un nervo misto e riceve le sue fibre da C7 e C8 nei Mammiferi Domestici e da C5 e C6 nell'Uomo. Si stacca dalla faccia laterale della parte media del plesso brachiale e si porta in direzione caudale e un pò ventrale. Descrivendo una o due flessuosità, incrocia la parte distale del muscolo sottoscapolare per raggiungere l'interstizio situato tra quest'ultimo e il muscolo grande rotondo. Incrocia l'arteria sottoscapolare prima di essere raggiunto dall'arteria circonflessa caudale dell'omero. Con essa e con la sua vena satellite, passa dietro all'articolazione della spalla e poi tra il muscolo piccolo rotondo e il capo lungo del tricipite brachiale. Arriva così sulla faccia profonda del muscolo deltoide. Termina a livello dell'estremità prossimale del capo laterale del muscolo tricipite brachiale mediante un mazzetto di rami, alcuni muscolari altri cutanei. I primi si distribuiscono ai muscoli piccolo rotondo, deltoide e cleidobrachiale. I rami cutanei sono due e differiscono per lunghezza e distribuzione. Uno è il **nervo cutaneo laterale craniale del braccio (*Nervus cutaneus brachii lateralis cranialis*)**- denominato nell'Uomo "Nervo brachiale laterale superiore"- che passa sul margine caudale del muscolo deltoide al quale fornisce alcuni filuzzi e si ramifica nella pelle della faccia laterale del braccio a livello della parte distale di questo muscolo e della parte prossimale del bicipite brachiale. Il suo territorio è relativamente ridotto negli Ungulati. L'altro ramo molto più lungo è il **nervo cutaneo craniale dell'avambraccio (*Nervus cutaneus antebrachii cranialis*)**. Nasce insieme al precedente o nelle sue immediate vicinanze ed esce tra la parte distale del muscolo deltoide ed il capo laterale del tricipite brachiale. Si divide generalmente in due rami, laterale e mediale, dopo aver attraversato la fascia brachiale. Questi rami si distribuiscono alla pelle della faccia craniale del gomito, dell'avambraccio e del carpo per un'estensione che corrisponde circa alla superficie del muscolo estensore radiale del carpo, variabile, tuttavia, a seconda della specie. I muscoli innervati dal nervo ascellare contribuiscono alla flessione

dell'articolazione scapolo-omerale e sono soprattutto abducenti del braccio e, con questo, dell'insieme dell'arto.

Nei Ruminanti il nervo ascellare annette alla sua origine il nervo toracodorsale, particolarmente grosso, il più caudale dei nervi sottoscapolari ed il "nervo del grande rotondo", che provengono dal suo tratto iniziale. La restante distribuzione corrisponde alla descrizione generale compreso anche il nervo cutaneo dell'avambraccio.

- **Nervo Radiale (*Nervus Radialis*):** è un grosso nervo che si origina dalla parte caudolaterale del plesso brachiale, le cui fibre provengono da C6, C7, C8 e T1 ed eventualmente da T2; in esso tuttavia predominano fortemente quelle di C8 associate a T1 o C7 o perfino ad entrambi. È un nervo misto in cui prevale la funzione motoria. Innerva tutti i muscoli estensori dell'avambraccio e della mano e la cute della regione laterale dell'avambraccio e di quella dorsale di parte della mano.

Tragitto e Rapporti: il tronco del nervo radiale si porta dapprima in direzione ventrocaudale, dorsocaudalmente ai nervi mediano ed ulnare e ventromedialmente ai nervi sottoscapolari. Raggiunge l'origine dell'arteria brachiale incrociando la faccia mediale dell'arteria sottoscapolare e discende caudalmente ad essa sotto la fascia del braccio per raggiungere l'estremità prossimale del capo mediale del muscolo tricipite brachiale. Assieme all'arteria profonda del braccio, si impegna tra il capo mediale ed il capo lungodel muscolo tricipite brachiale per contornare obliquamente, in direzione distolaterale, la parte media dell'omero seguendo il margine caudale del muscolo brachiale. Arriva così sotto il capo laterale del muscolo tricipite brachiale ed incrocia l'estremità prossimale della cresta sopracondiloidea laterale sul margine laterale dell'inserzione del muscolo estensore radiale del carpo (del muscolo estensore lungo nei Carnivori e nell'Uomo). Termina di solito mediante due branche, una profonda e l'altra superficiale. Il rapporto diretto con l'osso in quest'ultimo tratto del tragitto lo espongono a traumatismi che possono provocarne la paralisi.

Distribuzione: i **rami collaterali**, soprattutto motori, si distribuiscono ai muscoli caudali del braccio. Uno o due filuzzi, emessi prima che il

nervo radiale si impegni sotto il muscolo tricipite brachiale, si portano al muscolo tensore della fascia dell'avambraccio. Le branche più grosse si staccano proprio prima dell'impegno del nervo tra i capi mediale e lungo del muscolo tricipite brachiale, spesso mediante un brevissimo tronco comune; queste branche sono destinate al capo lungo (ed eventualmente al capo accessorio) del muscolo tricipite brachiale, al quale forniscono delle divisioni soprattutto ascendenti. Le altre branche si portano al capo mediale di questo muscolo. Altre ancora nascono dietro l'omero e vanno ai capi laterale e accessorio del muscolo tricipite brachiale. Negli Ungulati, alcuni filuzzi si rendono talvolta alla parte più distale del muscolo brachiale. Poco prima della sua biforcazione terminale, il nervo radiale emette, infine, **il piccolo nervo cutaneo laterale del braccio** (*Nervus cutaneus brachii lateralis caudalis*) che diventa superficiale sul margine craniale del capo laterale del muscolo tricipite brachiale e si distribuisce ad una piccola superficie cutanea a livello della parte distale del suddetto muscolo e dell'olecrano. Lungo e sottile nell'Uomo, questo nervo è esile nei mammiferi domestici ed è rappresentato talvolta da rami prossimali del nervo cutaneo laterale dell'avambraccio.

Il **ramo profondo** (*Ramus profundus*) è destinato ai muscoli dorsali dell'avambraccio. Prolunga il tronco del nervo radiale tra i muscoli brachiale ed estensore radiale del carpo (applicato al muscolo brachioradiale nei Carnivori e nell'Uomo) per raggiungere la faccia flessoria del gomito. Si continua poi a ridosso del radio sulla faccia profonda dei muscoli estensore radiale del carpo (duplice nell'Uomo) e comune delle dita, e distribuisce i suoi rami terminali ai muscoli abduuttore lungo del primo dito (pollice), estensore lungo del primo dito (pollice) ed estensore proprio dell'indice – o ai loro equivalenti negli Ungulati. Durante il suo tragitto emette rami per la capsula articolare del gomito e poi numerosi rami per i muscoli estensore radiale del carpo e brachioradiale, quando questo esiste. Nei Carnivori e nell'Uomo, dove incrocia in profondità il muscolo supinatore, ha fornito di passaggio un ramo a quest'ultimo. Un po' oltre, emette i nervi destinati ai muscoli estensori delle dita (o del dito negli Equidi), come pure al muscolo estensore ulnare del carpo (o ulnare laterale). Quest'ultimo muscolo, realmente estensore nell'Uomo ed in minor

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

misura nei Carnivori, diventa flessore del carpo negli Ungulati. Nonostante questa evidente eccezione, il nervo radiale è quindi realmente il nervo di tutti i muscoli estensori dell'avambraccio e del carpo.

Il ramo superficiale (*Ramus superficialis*) è cutaneo e la sua distribuzione è molto variabile da una specie all'altra. Si separa ad angolo assai acuto dal ramo profondo e discende sulla superficie del muscolo estensore radiale del carpo per diventare superficiale sul margine distale del carpo laterale del muscolo tricipite brachiale.

Diventa allora il **nervo cutaneo laterale dell'avambraccio** (*Nervus Cutaneus antebrachii lateralis*), esso pure diviso in due rami, laterale e mediale nei Carnivori, nel Maiale e nel Coniglio, mentre è unico nelle altre specie (nell'Uomo, il ramo mediale nasce separatamente sul nervo radiale, prima del ramo laterale che è il solo ad essere considerato un ramo superficiale del nervo radiale. Il ramo mediale quindi è considerato distinto e costituisce il nervo cutaneo posteriore dell'avambraccio). Si distribuisce alla pelle della regione laterale o dorsolaterale dell'avambraccio e poi fornisce a livello del carpo o della parte prossimale del metacarpo i nervi digitali dorsali delle dita I (se esiste), II e III e perfino IV, a seconda della specie. Si deve ricordare che l'innervazione sensitiva del dorso delle dita da parte dei nervi digitali propri provenienti dal nervo radiale non si estende oltre la metà della falange media, essendo la ragione ungueale innervata dai rami dorsali dei nervi palmari.

L'estensione e la varietà della sua distribuzione dimostrano che il nervo radiale presiede ad importanti funzioni. La motilità ne è di gran lunga la più evidente. Se il nervo è leso o interrotto in prossimità del plesso brachiale o dell'articolazione della spalla, tutti i muscoli estensori del gomito, del carpo e delle dita risultano paralizzati e l'arto assume un aspetto di semiflessione pronunciata. Le lesioni più frequenti avvengono, tuttavia, a livello della cresta sopracondiloidea laterale e quindi la motilità del gomito è quasi rispettata. La semiflessione del carpo e delle dita rimane invece assai evidente.

Nei Carnivori l'arto prende così appoggio mediante il dorso delle dita; gli Ungulati raschiano il suolo con la punta dello zoccolo.

Le particolarità di specie nei Ruminanti per quanto concerne il nervo radiale sono molteplici. In queste specie il nervo radiale è molto voluminoso. Fino a metà del braccio presenta i rapporti che abbiamo già descritto. Poco prima di impegnarsi sotto il muscolo tricipite brachiale, emette due grossi rami per il capo lungo di questo muscolo e un ramo più sottile per il capo mediale. Sotto il capo lungo del tricipite brachiale, fornisce un ramo al capo laterale di questo muscolo ed un altro al muscolo anconeo. Infine nel passaggio sotto il muscolo bicipite brachiale, emette spesso un ramo per la parte terminale del muscolo brachiale. Il nervo radiale si divide un po' più in alto, sotto il capo laterale del muscolo tricipite e il suo **ramo profondo** lo continua sotto i muscoli dorsali dell'avambraccio e vi si distribuisce secondo lo stesso piano ai muscoli estensori del carpo, estensori delle dita e ulnare laterale. **Il ramo superficiale** nasce sotto il margine distale del capo laterale del muscolo tricipite brachiale, tra i muscoli brachiale ed estensore radiale del carpo. Sulla superficie di quest'ultimo, attraversa la fascia dell'avambraccio e diventa il **nervo cutaneo laterale dell'avambraccio**, che discende davanti al muscolo estensore dorsale del carpo costeggiando il margine laterale della vena cefalica ed invia un sottile ramo che scende per esaurirsi sulla faccia dorsale del carpo e raggiungere, a sua volta, il carpo dividendosi medialmente. Poco prima ha ricevuto la divisione principale del nervo cutaneo mediale dell'avambraccio. Invia un piccolo ramo al margine mediale del metacarpo e si continua per un tratto più o meno lungo sulla faccia dorsale di quest'ultimo prima di fornire i nervi digitali comuni dorsali II e III.

C- NERVI DESTINATI ALL'ARTO TORACICO DESTINATI ALL'ADDUZIONE E ALLA FLESSIONE.

Sono i nervi sottoscapolari, muscolocutaneo, mediano e ulnare.

- Nervi Sottoscapolari (*Nervi Subscapulares*): generalmente in numero di due, provengono in proporzione variabile a seconda della specie, da C6 e C7, talvolta con una partecipazione di C8. Nascono dalla parte craniale del plesso, tesi nell'abduzione della spalla e assai flaccidi nell'adduzione, si portano in direzione ventrocaudale; si dividono in

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

numerosi fasci per penetrare nel muscolo sottoscapolare. Un ramo particolare deve essere ricordato: può prendere origine a seconda della specie tanto con il più caudale dei due nervi (C8) quanto sull'origine del nervo ascellare. Si innalza caudalmente ai precedenti e si distribuisce soltanto al muscolo grande rotondo e al margine caudale del muscolo sottoscapolare; ciò sottolinea la sua parentela con i nervi sottoscapolari. Per la sua disposizione, questo ramo è classificato nell'Uomo tra i nervi sottoscapolari ("nervo sottoscapolare inferiore") e denominato "nervo del grande rotondo" da numerosi anatomici veterinari. Descriverlo tra i rami del nervo ascellare è quindi discutibile.

Nei Ruminanti i nervi sottoscapolari hanno più punti di origine:

- a) uno solo proviene direttamente dal plesso e raggiunge la parte distale della faccia mediale del muscolo sottoscapolare;
 - b) un ramo più sottile si stacca dalla parte iniziale del nervo soprascapolare ed è destinato al margine craniale di questo muscolo;
 - c) Un ramo più grosso nasce con il nervo toracodorsale e si distribuisce al margine caudale del muscolo sottoscapolare come pure, mediante una branca particolare, al muscolo grande rotondo ("nervo del grande rotondo").
- Nervo muscolocutaneo (*Nervus musculocutaneus*): presenta disposizioni assai variabili da una specie all'altra a tal punto che i vecchi anatomici veterinari, trovandolo negli Ungulati assai differente da quello dell'uomo, preferirono denominarlo "nervo brachiale anteriore" in questi animali. Tali discordanze sono dovute al fatto che i nervi muscolocutaneo, mediano e ulnare, funzionalmente associati, si scambiano larghi fasci di fibre e perfino si uniscono per un tratto più o meno lungo de loro tragitto; alcuni rami sembrano così staccarsi dall'uno o dall'altro a seconda della specie. Queste variazioni si possono schematizzare nel modo seguente. Come si vedrà più avanti, il nervo mediano prende origine dall'unione di due radici, una laterale e l'altra mediale. Generalmente l'origine del nervo muscolocutaneo è associata alla radice laterale del nervo mediano e quella del nervo ulnare alla radice mediale.

Per quanto concerne il nervo muscolocutaneo – di cui si ricorderà che condivide in generale la sua origine con il o con i nervi pettorali craniali – esso può stabilire con il nervo mediano tre tipi di rapporti. 1) La separazione si stabilisce sin dal livello della radice laterale ed i due nervi sono paralleli ed indipendenti: è questo il caso dell’Uomo. 2) Il nervo muscolocutaneo è fuso con la radice laterale, qui robusta, e poi con il nervo mediano stesso fino a metà del braccio, dove avviene la separazione: questo si osserva negli Ungulati e nel Coniglio. 3) La radice laterale, sottile e assai lunga, è fusa con il nervo muscolocutaneo fino in vicinanza del gomito, dove raggiunge il nervo mediano rappresentato fino a questo livello soltanto dalla sua radice mediale, unita da parte sua al nervo ulnare nella prima metà del tragitto: ciò si riscontra nei Carnivori.

Tragitto e rapporti: Il nervo muscolocutaneo riceve le sue fibre dai rami ventrali di C6 e soprattutto C7, anche da C8 (negli Equidi sempre e nel Cane talvolta), perfino da C5 (nell’Uomo). Abbandona la parte craniale del plesso brachiale assieme alla radice laterale del nervo mediano e si porta in direzione ventrocaudale, medialmente al muscolo sottoscapolare.

Dopo aver incrociato la faccia laterale dell’arteria ascellare, si continua sulla faccia mediale del braccio, sul margine craniale dell’arteria brachiale, strettamente accollato al nervo mediano (Ungulati, Coniglio) o soltanto alla radice laterale di questo nervo (Carnivori) o da solo (Uomo). Negli Ungulati e nel Coniglio, descrive con la radice laterale del nervo mediano una curva che abbraccia dal di sotto l’arteria ascellare prima di raggiungere la radice mediale di questo nervo: è l’**ansa ascellare** (*Ansa Axillaris*). A questo livello fornisce il suo primo ramo muscolare. Nel braccio passa sul margine caudale inferiore del muscolo coracobrachiale (che attraversa nell’Uomo), segue il margine craniale dell’arteria brachiale venendone direttamente a contatto negli Equidi, nel Maiale e nel Coniglio, mentre le è meno strettamente addossato nelle altre specie. Se non è già indipendente, lo diventa nella parte distale del braccio e si impegna tra l’omero ed il muscolo bicipite brachiale. Termina a questo livello mediante due branche, una muscolare ed una cutanea.

Distribuzione: in prossimità del muscolo coracobrachiale, il nervo muscolocutaneo emette il **ramo muscolare prossimale** (*Ramus muscularis proximalis*) che passa, insieme all'arteria circonflessa craniale dell'omero, in direzione cranio laterale tra le due branche di questo muscolo o sulla sua faccia profonda, a seconda della specie. Fornisce a tale muscolo uno o due esili rami, poi raggiunge il muscolo bicipite brachiale, alla cui parte prossimale si distribuisce. Negli Ungulati, questo ramo proviene dall'ansa ascellare; con questa e con la radice laterale del nervo mediano, costituisce per i vecchi anatomici veterinari la totalità del "nervo brachiale anteriore", essendo la parte distale del nervo muscolocutaneo considerata come un collaterale del nervo mediano.

Dei due rami terminali del nervo muscolocutaneo, il **ramo muscolare distale** (*Ramus muscularis distalis*) è il più profondo e il più corto. Si divide quasi subito in due o tre branche che penetrano nel muscolo brachiale. Si deve ricordare che, negli Ungulati, la parte distale del muscolo brachiale riceve talvolta alcuni filuzzi del nervo radiale. L'altra branca terminale è il **nervo cutaneo mediale dell'avambraccio** (*Nervus cutaneus antebrachii medialis*). Continua il nervo di origine tra la parte terminale dei muscoli brachiale e bicipite brachiale per arrivare nella piega del gomito dal lato mediale del o dei muscoli estensori radiali del carpo. Invia uno o due filuzzi all'articolazione del gomito e attraversa la fascia dell'avambraccio per diventare sottocutaneo. Si distribuisce alla pelle della faccia mediodorsale dell'avambraccio e fino alla parte distale della faccia corrispondente del carpo. Questa zona cutanea è inoltre ampiamente invasa cranialmente da quella del nervo cutaneo laterale dell'avambraccio (nervo radiale) e caudalmente da quella del nervo cutaneo caudale dell'avambraccio (nervo ulnare). Questa zona può estendersi leggermente sulla parte prossimale del metacarpo. I rami terminali possono associarsi in maniera diversa con quelli dei nervi cutanei vicini, in particolare con il ramo mediale del nervo cutaneo laterale dell'avambraccio, per partecipare alla formazione dei nervi digitali comuni dorsali.

Nei Ruminanti il nervo muscolocutaneo riceve le sue fibre da C6 e C7. Il nervo cutaneo mediale dell'avambraccio si unisce verso il terzo distale dell'avambraccio, al principale ramo terminale del nervo

cutaneo laterale dell'avambraccio, per formare il tronco di origine dei nervi digitali comuni dorsali II e III; invia pure dei rami alla faccia mediale del carpo.

- *Nervo Mediano (Nervus medianus)*: è uno dei più voluminosi del plesso ed è misto. Condivide con il nervo ulnare, in maniera un po' più variabile a seconda della specie, l'innervazione dei muscoli della regione palmare dell'avambraccio (pronatori, flessori delle dita) e della mano, come pure quella della pelle che riveste queste regioni.

Prende origine mediante due radici, una **laterale** (*Radix lateralis*) e l'altra **mediale** (*Radix medialis*). La prima si fonde, come è stato detto, per un tratto più o meno lungo a seconda della specie, con il nervo muscolocutaneo e proviene dagli stessi segmenti del midollo spinale di questo nervo; in tale insieme, le fibre destinate al nervo mediano sono le più caudali (C7, C8). Questa radice incrocia lateralmente la parte terminale dell'arteria ascellare e contribuisce alla formazione dell'ansa ascellare negli Ungulati. La seconda radice è mediale e più caudale; riceve le sue fibre da T1 ed eventualmente da T2 e, in via accessoria, da C8. Passa sulla faccia mediale dell'arteria ascellare prima di essere raggiunta dalla radice laterale, sotto questa arteria o (Carnivori) molto più lontano nel braccio.

Tragitto e rapporti: il nervo mediano, dapprima accompagnato sul margine craniale dal nervo muscolocutaneo, condivide per tutta la lunghezza del braccio il tragitto dell'arteria brachiale. Nel tratto iniziale, è situato sul margine cranio-laterale dell'arteria, di cui incrocia molto più obliquamente la faccia mediale per poi diventare caudale.

Questo incrocio si effettua in prossimità della spalla nell'Uomo, verso la metà del braccio nei Ruminanti e nel Maiale, sulla faccia mediale del gomito negli Equidi e nel Coniglio. Nei Carnivori, la maggiorparte degli autori situa il suo tragitto sul margine caudale dell'arteria brachiale; come è già stato detto, in questo caso si tratta della lunghissima radice mediale, essa pure unita al nervo ulnare nella metà prossimale del braccio. La radice laterale, più esile, si separa dal nervo muscolocutaneo soltanto verso la metà del braccio nel Gatto, un po' al di sopra del gomito nel Cane, per incrociare l'arteria medialmente; erroneamente essa viene considerata come un semplice ramo

comunicante del nervo muscolocutaneo. Nel Gatto, il nervo mediano attraversa, assieme all'arteria brachiale, il foro sopracondilare dell'omero; tale disposizione può riscontrarsi eccezionalmente nel Maiale. Il nervo mediano raggiunge l'avambraccio davanti all'epicondilo mediale e passa, nei Carnivori, sulla faccia profonda del muscolo pronatore rotondo (tra i suoi due capi nell'Uomo). Nei Mammiferi domestici, quasi in prossimità del carpo, è satellite dell'arteria mediana. Si impegna con questo vaso sotto il margine caudale del muscolo flessore radiale del carpo e poi, al di sotto di questo, accompagna il margine corrispondente del muscolo flessore profondo delle dita. Questi rapporti muscolari variano più o meno in funzione della disposizione dei muscoli flessori delle dita. Nell'Uomo, la cui arteria mediana è di solito vestigiale o assente, il nervo presenta tuttavia lo stesso tipo di rapporti con i muscoli flessori delle dita prima di ritornare superficiale in prossimità del polso tra i tendini dei muscoli flessore radiale del carpo e flessore superficiale delle dita. Termina, in modo un po' variabile a seconda della specie, nella parte distale dell'avambraccio. I suoi rami terminali attraversano il canale del carpo per raggiungere il metacarpo. Forniscono i nervi digitali comuni palmari dal I (se esiste il pollice) al III.

Distribuzione: i **rami collaterali** sono quasi tutti muscolari. Il primo, sottile, viene emesso proprio al di sopra del gomito ed è destinato al muscolo pronatore rotondo; è presente soltanto in quelle specie in cui questo muscolo esiste. A livello del gomito vengono emesse alcune fibre destinate a questa articolazione. Gli altri rami formano un gruppo molto più consistente nella parte prossimale dell'avambraccio, poco dopo la penetrazione sotto il muscolo flessore radiale del carpo; sono destinati a quest'ultimo muscolo e soprattutto al muscolo flessore superficiale delle dita. Alcune fibre si portano alla parte adiacente del muscolo flessore profondo delle dita. A livello dell'origine dell'arteria interossea palmare (o dell'interossea comune a seconda della specie) si stacca il sottile **nervo interosseo dell'avambraccio** (*Nervus interosseus antebrachii*). Accompagnato da questa arteria, il nervo decorre sulla faccia palmare ("anteriore" nell'Uomo e "posteriore" negli animali) del radio fino a raggiungere il capo radiale del muscolo flessore profondo delle dita (flessore lungo del pollice nell'Uomo) nel

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

quale termina dopo avere inviato fibre all'articolazione distale delle ossa dell'avambraccio. Quando esiste il muscolo pronatore quadrato (Carnivori, Uomo), il nervo interosseo decorre tra questo muscolo e la membrana interossea e lo innerva di passaggio. Prima di raggiungere il carpo, fornisce ancora uno o più **rami comunicanti** per il nervo ulnare, la cui disposizione varia a seconda della specie. Infine, un **ramo palmare** (*Ramus palmaris*), emesso un po' al di sopra del carpo, innerva nell'Uomo e nei Carnivori la pelle della parte palmare distale dell'avambraccio, l'eminenza thenar e la base del pollice. Negli Ungulati è rimpiazzato dai rami cutanei del nervo digitale comune destinati alla pelle della faccia mediale del metacarpo. I **rami terminali** sono rappresentati dai nervi digitali comuni palmari dal I al III, la cui disposizione varia evidentemente con il numero delle dita. Tutti questi rami sono sensitivi ad eccezione del più vicino al margine polliciale che innerva inoltre i muscoli propri del pollice.

Nei Ruminanti, il nervo mediano è unito al nervo ulnare e, come già detto, al nervo muscolocutaneo in corrispondenza del gomito. Da tenere presente che il tronco che forma con i nervi muscolocutaneo ed ulnare si situa sul margine mediocraniale dell'arteria brachiale. Inoltre, a ridosso dell'estremità prossimale del radio, il nervo mediano passa, assieme all'arteria mediana e alla sua vena satellite, tra quest'osso e il rudimento del muscolo pronatore rotondo, al quale abbandona alcune fibre. Un po' al di sopra del carpo, fornisce un ramo cutaneo che si distribuisce alla faccia mediale del carpo e prossimale del metacarpo. Accompagna in seguito il margine mediale del tendine del muscolo flessore profondo delle dita, con il quale attraversa il canale del carpo assieme all'arteria mediana e, al di là del quale, si continua mediante il tronco di origine dei nervi digitali comuni palmari II e III.

- **Nervo Ulnare (*Nervus Ulnaris*):** innerva la parte che si estende dalla regione olecranicca al V dito incluso. Prende origine nella parte caudale del plesso brachiale insieme alla radice mediale del nervo mediano e riceve le sue fibre dai rami ventrali di C8 e T1 ed eventualmente T2.

Tragitto e rapporti: nella sua parte iniziale il nervo ulnare è associato al nervo mediano, costeggiandolo più o meno in prossimità del margine caudale. Nei Carnivori, rimane unito alla radice mediale del nervo

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

mediano fino alla parte distale del braccio. Negli Equidi e nel Coniglio, la separazione avviene prima che la radice caudale abbia raggiunto l'ansa ascellare (molto prima nell'Uomo). Al contrario, nei Ruminanti e nel Maiale, tale separazione ha luogo soltanto verso la metà del braccio. In ogni caso, il tragitto dei due nervi rimane parallelo fino alla metà del braccio e , negli Equidi e nel Coniglio i due nervi sono separati dall'arteria brachiale, mentre sono situati caudalmente ad essa nelle altre specie.

Fino in vicinanza dell'inserzione sull'omero del muscolo grande rotondo, il nervo ulnare è inoltre accompagnato caudalmente dal nervo radiale. Verso la metà del braccio, si allontana dall'arteria brachiale per costeggiare il margine craniale del capo mediale del muscolo tricipite brachiale prima di essere raggiunto dall'arteria collaterale ulnare. Negli Equidi e per una minore estensione nelle altre specie, è coperto medialmente dal muscolo tensore della fascia dell'avambraccio (che manca nell'Uomo).

Assieme all'arteria e alla vena satelliti, passa sulla faccia caudale dell'epicondilo mediale dell'omero per arrivare tra i due capi del muscolo flessore ulnare del carpo. Decorre tra il capo ulnare di quest'ultimo e i muscoli flessori delle dita e penetra nell'intersizio che separa i muscoli ulnare laterale e flessore ulnare del carpo dove è quasi superficiale sotto la robusta fascia caudale dell'avambraccio. A una certa distanza dall'osso pisiforme, verso il quale convergono i tendini di terminazione dei due muscoli, termina biforcandosi in un ramo dorsale e in un ramo palmare.

Distribuzione: la prima delle **branche collaterali** viene emessa verso la metà del braccio o un po' più lontano: è il nervo cutaneo caudale dell'avambraccio (*Nervus cutaneus antebrachii caudalis*) che si stacca dal margine caudale del nervo ulnare e se ne allontana ad angolo acuto. Questo nervo si insinua tra i muscoli tensori della fascia dell'avambraccio e pettorale trasverso per diventare superficiale. Incrocia la faccia mediale dei muscoli che coprono l'olecrano, poi discende ramificandosi sotto la pelle della faccia caudale dell'avambraccio.

Quest'area cutanea si estende fin sulla faccia palmare del carpo e deborda, sulla faccia laterale, su quella innervata dal nervo radiale e,

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

soprattutto, sulla faccia mediale, su quella innervata dal nervo muscolocutaneo. Il nervo ulnare emette nell'avambraccio- dopo aver dato qualche filuzzo per la parte caudale dell'articolazione del gomito- **i suoi rami muscolari**, che si staccano un po' al di sotto del gomito. Questi rami si distribuiscono ai muscoli flessore ulnare del carpo e flessore superficiale delle dita, come pure al capo ulnare e alla parte prossimale del capo omerale del muscolo flessore profondo delle dita. Il primo dei due rami terminali è il **ramo dorsale** (*Ramus dorsalis nervi ulnaris*). Esce dall'interstizio delimitato dai muscoli flessore ulnare del carpo ed ulnare laterale, attraversa la fascia antibrachiale palmare e passa in posizione superficiale sulla faccia laterale del carpo. Arrivato sulla faccia dorsale della giunzione carpometacarpale può scambiare un ramo comunicante con la divisione vicina del nervo cutaneo laterale dell'avambraccio.

Termina mediante il nervo digitale proprio abassiale del dito più laterale (V o IV a seconda della specie) ed il nervo digitale comune più laterale.

L'altra terminazione del nervo ulnare, nettamente più grossa, è il **ramo palmare** (*Ramus palmaris nervi ulnaris*) che continua direttamente il nervo di origine e si impegna nel carpo caudalmente all'osso pisiforme. Termina a partire da questo livello mediante due rami dapprima paralleli e adiacenti, che si separano quando arrivano sul metacarpo. **Il ramo superficiale** (*Ramus superficialis*) fornisce generalmente il nervo digitale abassiale del dito V (quando questo dito esiste) e il nervo digitale comune palmare IV; invia, inoltre un ramo comunicante al nervo digitale comune almare III. **Il ramo profondo** (*Ramus profundus*) si incurva a ridosso della faccia palmare della parte prossimale dei muscoli interossei palmari e fornisce, oltre a filuzzi per i muscoli del dito V, **i nervi metacarpali** (*Nervi metacarpei*) che innervano tutti i muscoli interossei (ivi compreso il muscolo interosseo dorsale I nell'Uomo.)

Nei Ruminanti riceve le sue fibre soltanto da C8 e da T1. All'inizio è intimamente unito alla radice mediale del nervo mediano e poi al margine caudale di questo nervo e si applica con esso contro l'arteria brachiale fin verso la metà del braccio. Verso il terzo distale

dell'avambraccio, termina mediante le due solite branche, dorsale e palmare.

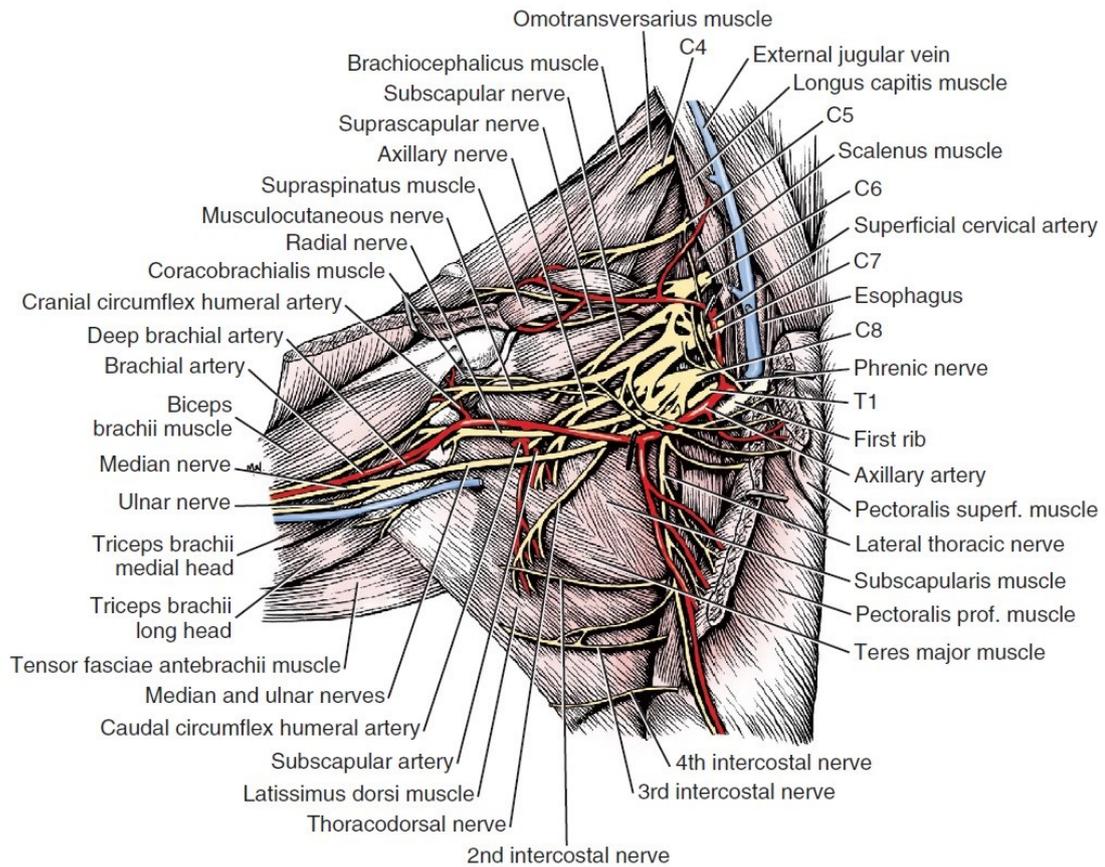


Fig. 10. Immagine plesso brachiale destro, aspetto ventrale. Da "Miller anatomy of the dog", 1965).

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

2.2 LESIONI DEL PLESSO BRACHIALE

Le Lesioni del Plesso brachiale (BPLs) sono lesioni molto gravi che portano all'incapacità parziale o totale della parte superiore del braccio. Il numero traumatico di BPLS è in aumento, essendo gli incidenti in moto una delle più frequenti cause (Dubuisson, 2002). Un'altra causa importante di è rappresentata dalle ferite che si verificano nel personale militare come conseguenza delle attività belliche (Songer, 2000). Risultati soddisfacenti dopo la ricostruzione di BPL sono generalmente difficili da raggiungere (Ali, 2014). Un problema è la corretta caratterizzazione della topografia del plesso brachiale (BP) (Birch, 2014).

Le lesioni del plesso brachiale possono variare da disfunzioni transitorie a carico dell'arto a lesioni parziali o complete. Lesioni significative portano a disabilità fisica, oltre a disagio psicologico ed economico. La gestione di questi casi è spesso complicata da lesioni concomitanti che possono ritardare o falsare la valutazione neurologica.

Le lesioni del plesso brachiale possono essere causate da diversi fattori e possono essere classificate in:

- lesioni chiuse
 - da trazione
 - da compressione
 - lesioni combinate
- lesioni aperte
 - da taglio
 - da arma da fuoco
- radiazioni

Le **lesioni da trazione** derivano dalla separazione forzata del collo dalla spalla o delle braccia dal tronco. La gravità della lesione sul nervo è determinata sia dalla direzione della forza di trazione applicata, sia dalla sua energia. Lesioni da trazione ad alta energia sono la causa principale delle lesioni del plesso brachiale nell'uomo e sono generalmente causate da incidenti stradali, per lo più in moto. Lesioni a bassa energia hanno invece un'incidenza minore e sono legate in genere a cadute dall'alto, traumi causati da oggetti pesanti o lesioni sportive (rugby, football americano).

Le **lesioni da compressione** si verificano quando una forza traumatica comprime la spalla in direzione cervico-caudale, comprimendo il plesso tra clavicola e prima costa. Altre cause di compressione del plesso sono le fratture a carico della colonna cervicale, del processo coracoideo della clavicola, del collo omerale, del collo della scapola o della spina scapolare. Tra le cause traumatiche di compressione del plesso ricordiamo la compressione acuta da cinture di sicurezza in seguito a incidenti stradali. Compressioni croniche causate dalla manipolazione di carichi troppo pesanti possono invece determinare lesioni temporanee.

Le **lesioni aperte** sono meno comuni rispetto a quelle chiuse.; possono essere causate da ferite da taglio e da punta che di solito interessano solo una parte del plesso e sono in genere legate ad una buona prognosi. Lesioni da taglio iatrogene possono verificarsi in seguito a resezioni tumorali a livello del collo o dell'area sopraclavicolare o occasionalmente in seguito a divaricamento dei tessuti o lesione diretta durante interventi chirurgici (mastectomie, biopsie linfonodali, ecc). Le ferite da arma da fuoco si possono riscontrare sia in ambito militare che civile. Questo tipo di ferita può essere accompagnata da gravi lesioni vascolari e/o da lesioni toraciche. Devono essere considerate separatamente dalle ferite da taglio poichè vi sono importanti differenze nell'entità e nel tipo di danno a carico dei nervi e dei tessuti circostanti. Nelle lesioni da arma da fuoco, la causa della frammentazione del tessuto è l'alta velocità e la rotazione del proiettile: il tessuto viene prima schiacciato dal contatto diretto con il proiettile e quindi stirato. L'entità del danno tissutale dipende dalla massa del proiettile, dalla sua forma e dalla velocità. Lesioni da arma da fuoco a bassa velocità si verificano più comunemente in ambito civile. Questo tipo di lesione del plesso brachiale, se non associata a gravi danni vascolari, ha in genere una buona prognosi. Le ferite da arma da fuoco ad alta velocità sono caratterizzate invece da una penetrazione tissutale maggiore e producono una lesione più estesa e diffusa in cui è difficile definire l'entità del danno a carico del tessuto nervoso in fase precoce. Sono descritte principalmente in ambito militare o in seguito a incidenti di caccia.

Le lesioni traumatiche del plesso possono essere classificate anche in base alla localizzazione anatomica in relazione alla clavicola in:

- **sopraclavicolare**
- **retroclavicolare**
- **sottoclavicolare.**

Non si è raggiunta alcuna vera svolta nel trattamento delle BPL dopo l'avvento della microchirurgia quattro decenni fa (Birch, 2014).

CAPITOLO 3

NEUROBOX

Dal punto di vista del biomateriale, ci sono tre distretti strutturali in una guida nervosa, e cioè: (A) la struttura esterna, che è sostanzialmente il tubo all'interno del quale sono alloggiati i monconi del nervo; (B) la struttura interna, che è come il tubo viene fissato; (C) la sutura, che è il luogo in cui una forza meccanica viene applicata alla guida e dove un insulto meccanico e biologico viene ricevuto dal moncone del nervo. Il punto di sutura è ancora il metodo più consigliato per tenere la guida al suo posto, ma la sutura è una causa ben nota di risposta infiammatoria locale. Sono state proposte come alternativa colle di diversi tipi ma, purtroppo, si sono rivelate di non facile applicazione in un vero e proprio "ambito chirurgico, dove la presenza di sangue e di altri fluidi è altamente variabile e poco maneggevole.

Nel 2006 alcuni autori hanno sviluppato e testato in vivo, un nuovo concetto di guida neurale denominato " NeuroBox " (brevetto WO / 2008/029373) che è un box "doppio dimezzato" , non-degradabile e rigido, e non richiede l'uso di alcun punto di sutura al moncone del nervo, permettendo invece l'uso di colle di cianoacrilato.

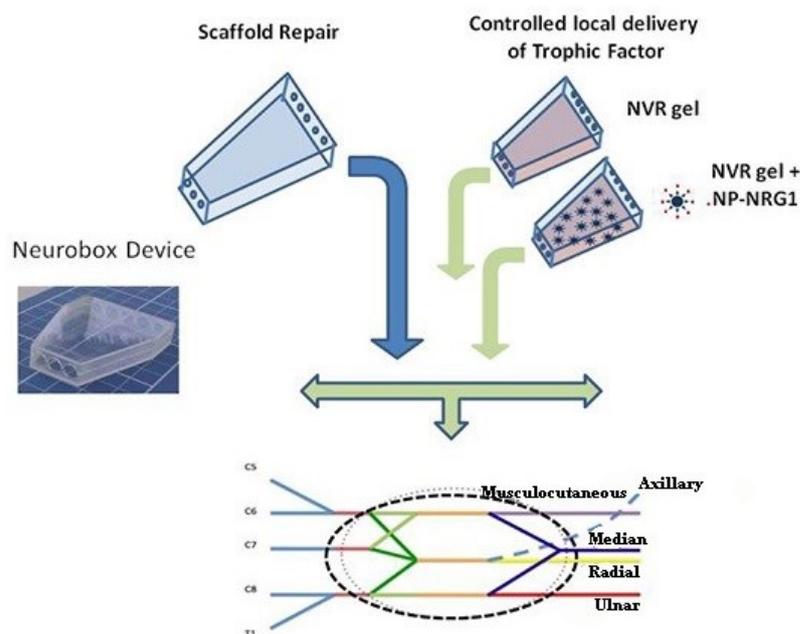


Fig 11. Neurobox, da Merolli.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

Il dispositivo ha dimostrato di consentire una rigenerazione nervosa di successo in vivo. Nello studio sperimentale condotto sui roditori, gli autori hanno analizzato istologicamente l'interfaccia nervo-colla in vivo. La loro ipotesi è che la piccola invasività nell'applicazione dell'etil-2-cianoacrilato direttamente all'epineurio (che è consentito dal particolare design del dispositivo) è funzionale alla mancanza di significativi insulti alle fibre nervose (che sono stati osservati) e questo ha contribuito significativamente al successo della rigenerazione dei nervi (Merolli, 2010).

Nel NeuroBox la guida neurale cilindrica tradizionale è sostituita da una scatola di due metà in cui sono riconoscibili tre compartimenti principali: (1) una guida (scanalatura) per il moncone neurale (uno prossimale e distale); (2) un vano per la colla acrilica (uno prossimale e distale); (3) una "camera di rigenerazione" piatta, dove gli assoni allungandosi dal moncone prossimale sono invitati a diffondere. L'Etile-2-cianoacrilato (Loctite, Henkel, Germania) è stato impiegato come collante di cianoacrilato. Il compartimento dedicato alla colla del NeuroBox promuove la polimerizzazione della colla con la minima quantità necessaria perché venga bagnata. I monconi neurali sono gentilmente ospitati nei loro compartimenti, nella metà inferiore della guida, appena prima della fine del processo di polimerizzazione. La colla acrilica è conforme ai monconi. La metà superiore viene posizionata gentilmente in modo da chiudere il dispositivo simmetricamente (bagnando, con la colla, i comparti ad essa dedicati della metà superiore). Tuttavia, la guida NeuroBox non può essere considerata completamente sigillata, ma al contrario, un minimo di spazio vuoto rimane in entrambi gli ingressi in modo tale che i fluidi e le cellule possano accedere alla camera di rigenerazione (Merolli, 2010). Un punto critico che deve essere affrontato è la necessità di utilizzare collanti biocompatibili in sostituzione di microsuture (punti). Il trattamento chirurgico stabilito nel sezionamento acuto di un nervo periferico con lama affilata, con gap trascurabile o assente, prevede l'unione dei due monconi con una sutura end-to-end (neurorrafia). È ampiamente accettato che la sutura non dovrebbe mettere i due monconi sotto stress tensionali, perché questo favorirà notevolmente lo sviluppo di una proliferazione fibroblastica e miofibroblastica. Questo fenomeno, qualunque sia la causa, potrà mettere in pericolo, e infine interrompere, qualsiasi rigenerazione assonale. Però, anche senza tensione dei monconi, è l'uso di punti per la sutura (sia degradabile sia non degradabile) che promuove la

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

proliferazione fibroblastica e miofibroblastica e può provocare reazione infiammatoria e fibrosi sufficiente a compromettere la rigenerazione dei nervi. La proliferazione fibroblastica e miofibroblastica e l'eventuale retrazione della cicatrice chirurgica sono tra gli eventi più avversi della rigenerazione delle fibre nervose; non sono facilmente evitabili, ma, d'altra parte, non dovrebbero essere favoriti utilizzando punti di sutura. In considerazione di ciò, l'uso di suture dovrebbe essere abbandonato in favore di colle biocompatibili in qualsiasi intervento chirurgico associato a strutture neurali e guide nervose artificiali. Purtroppo, la conoscenza sui collanti è limitata. Inoltre, l'uso di colla in un vero ambito chirurgico presenta ancora molti problemi irrisolti. In linea di principio, non è facile controllare l'apposizione della colla, che non dovrebbe essere troppo veloce, per dare al chirurgo il tempo sufficiente per mettere con precisione i monconi in sede, ma non dovrebbe essere troppo lenta, per evitare un accidentale flusso di parte della colla di fronte al moncone con una conseguente sua fissazione. Inoltre anche il metodo di applicazione della colla in un ambiente reale chirurgico può essere un problema. Il concetto della scatola può aiutare nell'impianto chirurgico della guida. E' più facile per accogliere i monconi del nervo all'interno della metà della scatola con il minor danno possibile, anziché tentare di posizionare il moncone in una guida tubulare di diametro prestabilito. L'uso dei punti può essere abbandonato poiché i monconi saranno tenuti in posizione da una colla che viene posta tutto intorno al nervo. Una guida rigida, in linea generale, può fornire una migliore protezione meccanica ai sottili e fragili assoni in rigenerazione (Merolli, 2009).

CAPITOLO 4

4.1 SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di verificare, nel modello sperimentale ovino, l'utilità di una neuro guida "Neurobox" nella rigenerazione di lesioni dei tronchi del plesso brachiale con ampio gap.

4.2 STUDIO PILOTA

Obiettivi dello studio pilota:

- Idoneità dell'ovino come modello animale per lo studio delle lesioni del plesso brachiale e la loro rigenerazione;
- Individuare le dimensioni ideali per l'impiego del Neurobox nell'ovino di razza sarda e tollerabilità dell'impianto;
- Valutare benessere animale in caso di lesioni del plesso brachiale;
- Evidenziare eventuali problematiche non previste.

Materiali e Metodi

Sono state utilizzate 2 pecore di razza Sarda, femmine, di età adulta e di peso medio di 40 kg (range 38- 42 kg), clinicamente esenti da patologie infettive, parassitarie e muscolo-scheletriche.

Con l'animale posto in decubito laterale, in regime di anestesia generale, si è proceduto all'approccio chirurgico alle radici del plesso brachiale. La procedura ha previsto una incisione cutanea longitudinale, di circa 15 cm di lunghezza, dorsalmente alla doccia giugulare e ventralmente ai processi trasversi cervicali. L'incisione veniva effettuata dalla quinta vertebra cervicale sino alla prima costa, quindi si è proceduto raggiungendo le radici nervose che sono state isolate e inserite nel dispositivo Neurobox. A questo punto si è proseguito con la sezione completa delle fibre nervose alloggiato nel Neurobox. In seguito alla sezione delle fibre nervose si osservava una immediata retrazione dei monconi (Fig 12). Si è provveduto quindi alla deposizione di colla di cianoacrilato sulla superficie dei monconi nervosi e ai lati del dispositivo in maniera da sigillare il sistema bivalve. Ricostruzione dei tessuti *lege artis*.

Durante lo studio pilota sono stati valutati:

- precisione e accuratezza dell'accesso chirurgico;
- dimensione del Neurobox in rapporto alle fibre nervose;
- possibilità di ricostruzione dei tessuti molli in modo da non provocare compressione, tensione superficiale o profonda sulle strutture vicine;
- durata della chirurgia ed eventuali complicanze cliniche e anestesilogiche.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

Nel periodo post operatorio, nel rispetto del benessere animale, i pazienti sono stati ricoverati in ambienti idonei, in presenza di almeno altri due capi e hanno ricevuto una terapia antibiotica, antinfiammatoria ed analgesica per almeno 5 gg. Gli animali sono stati valutati quotidianamente tramite esame obiettivo generale ed esame neurologico; sono state registrate complicanze a breve (entro le 24 ore) e a lungo termine (entro 30 giorni). I capi sono stati sottoposti ad eutanasia rispettivamente dopo 2 e 4 settimane dalla chirurgia. Il Neurobox è stato prelevato e sottoposto ad esame istologico.

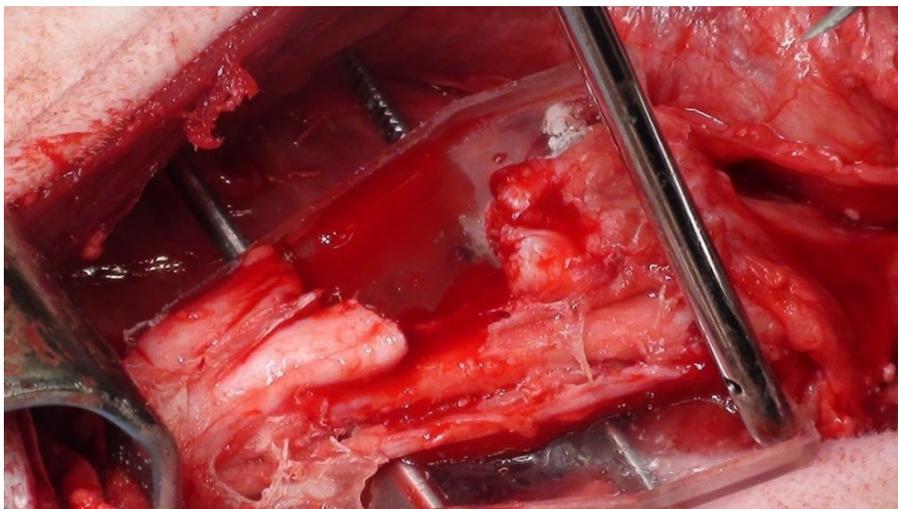


Fig 12. Particolare intraoperatorio: retrazione dei monconi in seguito a tomia.

Risultati e discussione

Il posizionamento del paziente in lieve anti Trendelenburg, decubito laterale, sul lato opposto a quello da trattare, e con la scapola retratta caudalmente, ha permesso un semplice e ripetibile approccio alle radici del plesso brachiale senza complicanze anestesologiche. Il corretto posizionamento costituisce un elemento critico durante gli interventi chirurgici poiché deve soddisfare le esigenze del chirurgo e dell'anestesista. Nei ruminanti in particolare, la polmonite *ab ingestis* e la dilatazione del comparto gastrico rappresentano complicanze prevedibili che devono essere evitate o prevenute.

L'individuazione del processo trasverso di C6, particolarmente prominente negli animali, e del bordo craniale della prima costa hanno permesso un

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

rapido e preciso raggiungimento delle radici nervose senza richiedere la sezione dei fasci muscolari sovrastanti, omo-trasversario e braccio-cefalico.

Lo studio ha messo in luce la necessità di ridurre le dimensioni del Neurobox. Infatti, il Neurobox, era stato stampato in 3d prendendo in considerazione i dati presenti in letteratura riferiti a razze ovine differenti, di maggiore mole rispetto alla razza sarda da noi utilizzata. Pertanto il Neurobox è stato modificato per le fasi successive in modo da contenere al meglio i fasci nervosi e poter essere alloggiato *in situ*. Così come osservato nel ratto (Merolli, 2009), il dispositivo si è mostrato inerte, non ha determinato reazione sistemica né locale, se non la stimolazione di un normale processo di incapsulamento. L'uso della colla ha consentito la chiusura delle due valve assicurando l'isolamento delle radici.

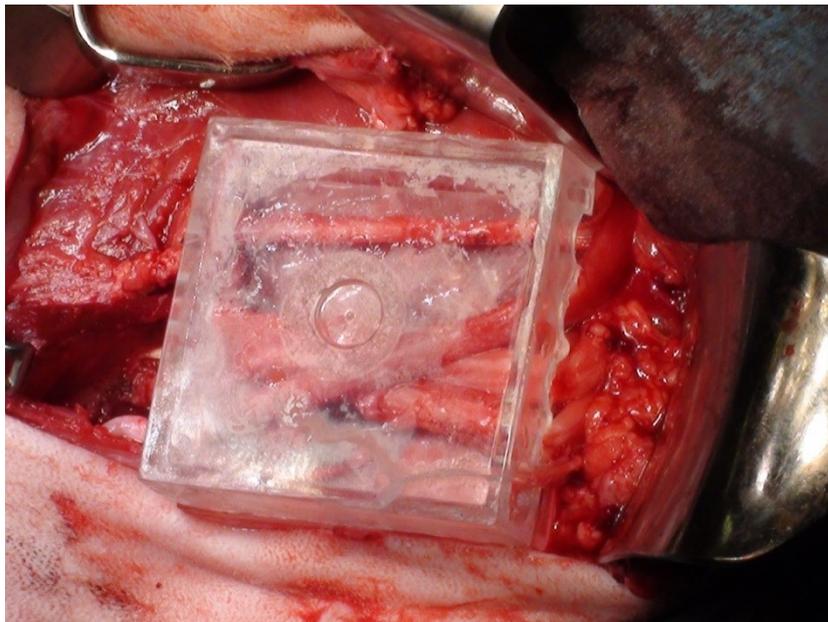


Fig 13. Immagine intra operatoria nel soggetto 1 dello studio pilota.

Entrambi i capi operati hanno mostrato immediatamente dopo il risveglio una paresi non deambulatoria a carico dei 3 arti. La sintomatologia non appariva riconducibile a stati patologici pre-operatori, alla procedura chirurgica o al posizionamento in sala risveglio. La sintomatologia si è mantenuta stabile per tutto il periodo dello studio senza alcuna risposta alla

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

terapia medica con antinfiammatori non steroidei e antibiotici, né in alcun modo ridotta dalla fisioterapia palliativa (argano e palloni fisioterapici).

Al momento dell'eutanasia si è proceduto con l'esame autoptico completo. L'esame istologico del midollo spinale ha evidenziato la presenza di un fenomeno degenerativo della sostanza bianca a partire dal tratto cervicale e discendente in senso caudale fino ai tratti toracici.

In assenza di altre patologie emerse dall'esame autoptico, è stato ipotizzato un danno iatrogeno legato all'uso dell'elettrocauterio durante l'isolamento delle radici nervose a ridosso della loro emergenza dal canale vertebrale.

Per questo motivo successivamente è stata evitata ogni forma di stimolazione elettrica sui nervi.

Durante il recupero è emerso come in entrambi i casi il dispositivo fosse rimasto alloggiato nella sede in cui era stato posizionato senza determinare compressione ai tessuti vicini. Non è stata evidenziata presenza di tessuto cicatriziale attorno al dispositivo e l'esame istologico del rigenerato ha mostrato la presenza di un ematoma in via di riassorbimento e organizzazione e nessuna reazione anomala legata alla presenza della colla.

I risultati dello studio pilota hanno permesso di confermare che nell'ovino il raggiungimento del plesso brachiale è di semplice, rapida, precisa e ripetibile esecuzione. In particolare, l'assenza della clavicola, la topografia del plesso brachiale, le notevoli dimensioni delle radici nervose, molto simili a quelle dell'uomo, consentono di confermare l'idoneità dell'ovino quale modello animale per la realizzazione dello studio.

Tuttavia lo studio pilota ha messo in luce la necessità di apportare due importanti modifiche al progetto:

- a) modificare le dimensioni del dispositivo sulla base della mole della pecora di razza sarda;
- b) evitare la lesione completa del plesso a favore di una parziale per assicurare un uso seppur limitato dell'arto.

4.3 STUDIO SPERIMENTALE

4.3.1 MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 8 ovini di razza Sarda, femmine, di età adulta, del peso medio di 39kg (range 25- 47,5 kg), clinicamente esenti da patologie infettive, parassitarie e muscolo-scheletriche.

Tutti gli animali sono stati sottoposti prima della chirurgia a visita clinica ed esame coprologico. Essendo risultati positivi a nematodi gastro-intestinali (*Trichuris spp*), strongili bronco-polmonari (*Muellerius*) e Trematodi (*Dicrocoelium*), tutti i capi sono stati sottoposti a trattamento antiparassitario e ritestati.

Gli animali sono stati sottoposti a neurotmesi rispettivamente di 3 (7 capi) e di 4 fasci (1 capo) del plesso brachiale.

PROTOCOLLO ANESTESIOLOGICO

Previo digiuno pre-operatorio di 12 ore, tutte le procedure chirurgiche sono state eseguite adottando il medesimo protocollo anestesio logico.

La preanestesia è stata eseguita mediante somministrazione di Fentanil (Fentanest® 0.1 mg/2 ml; Pfizer) 5 µg/kg e.v. e Diazepam (Valium® 10 mg/2ml; Roche) 0,3 mg/kg e.v.

Dopo 15 minuti dalla premedicazione è stata effettuata l'induzione dell'anestesia generale con Lidocaina (Lidocaina 2%® 20 mg/ml) 1,5 mg/kg e.v. e Tiopentale (Pentothal Sodium® 1 g/50 ml, MSD Animal Health) 5 mg/kg e.v. per consentire l'intubazione del soggetto.

L'anestesia generale è stata mantenuta con Desflurano (Suprane; Baxter Healthcare) con valori di EtDes prossimi al 7% (D-Vapor Dräger Medical, Lübeck, Germania) erogato in una miscela di ossigeno ed aria medica le per assicurare una frazione inspiratoria di O₂ (FiO₂) compresa tra 0.5-0.6. In 5 casi la ventilazione è stata spontanea, mentre in 3 soggetti si è resa necessaria la ventilazione meccanica a controllo volumetrico (Fabius GS Premium; Dräger, Lübeck, Germania) con frequenza respiratoria (12

atti/minuto) e volume tidalico atti a mantenere la tensione di CO₂ a fine espirazione (EtCO₂) tra 37 – 42 mmHg.

L'analgesia intra-operatoria è stata effettuata mediante somministrazione di Lidocaina in infusione continua (CRI) a 5 µg/kg/h mentre nel post-operatorio è proseguita con Metadone (Semfortane 10mg/ml) 0,2 mg/kg ogni 4 ore e successivamente con Buprenorfina a 20 µg/kg (Buprenodale 0,3 mg/ml) ogni 6 ore.

TECNICA CHIRURGICA

Gli animali sono stati posizionati in decubito laterale, in lieve anti trendelenburg, con l'arto anteriore spostato caudalmente.

In seguito ad accurata disinfezione e preparazione del campo operatorio, l'arto da trattare è stato posizionato in massima estensione per permettere l'identificazione dei *punti di repere* con maggiore facilità. È stata effettuata, dorsalmente alla doccia giugulare e parallelamente alle vertebre cervicali, un'incisione cutanea di circa 15 cm, a partire dalla quinta vertebra cervicale sino alla prima costa. Ha fatto seguito l'incisione del muscolo pellicciaio e lo scollamento del tessuto adiposo, mentre la scapola è stata retratta caudalmente mediante l'utilizzo di divaricatori in modo da consentire l'esposizione di alcune branche del plesso. La regione è stata raggiunta separando i ventri dei mm. omo-trasversario e brachio-cefalico. Quindi si è proceduto al raggiungimento delle radici nervose e al loro isolamento.

La procedura ha previsto l'inserimento all'interno del Neurobox dei fasci costitutivi i nn. Radiale, Mediano ed Ascellare (Fig 14). La parte inferiore del dispositivo veniva inserita al di sotto delle componenti nervose, si procedeva all'applicazione della colla di cianoacrilato sul bordo e all'interno del Neurobox, in modo da mantenere in sede i monconi una volta provocata la lesione e veniva eseguita quindi la nevrotomia (Fig 15). Si è proceduto con la neurotmesi dei fasci costitutivi i nn. Radiale, Mediano ed Ascellare in 6 casi; il Radiale e Mediano in 1 caso (403) per mancanza di spazio all'interno del Neurobox; neurotmesi di tutti i fasci contenuti nel Neurobox in 1 caso (406). Subito dopo la tomia si osservava la rapida retrazione dei monconi nervosi

(Fig. 12 e 16) e si procedeva con la rapida chiusura del dispositivo incollando i bordi del neurobox l'uno all'altro con la colla (Fig. 17). Il dispositivo veniva mantenuto tramite pinza per circa 1 minuto per consentire il completamento della polimerizzazione della colla. Infine si proseguiva con la ricostruzione dei tessuti molli e con la sutura cutanea.

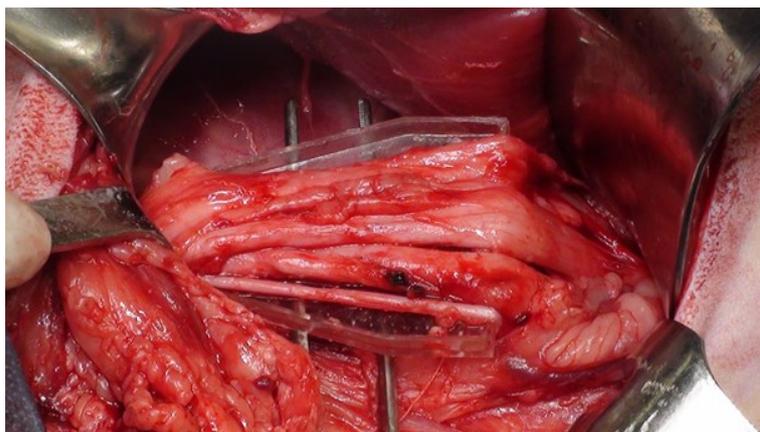


Fig. 14 Posizionamento Neurobox.

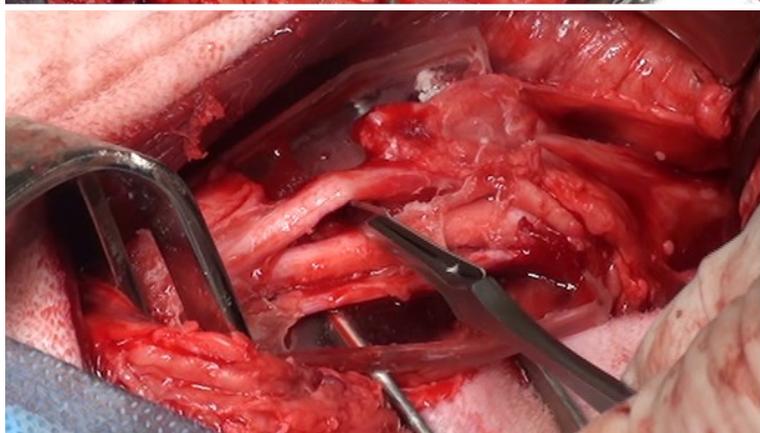


Fig 15. Tomia Nervo.

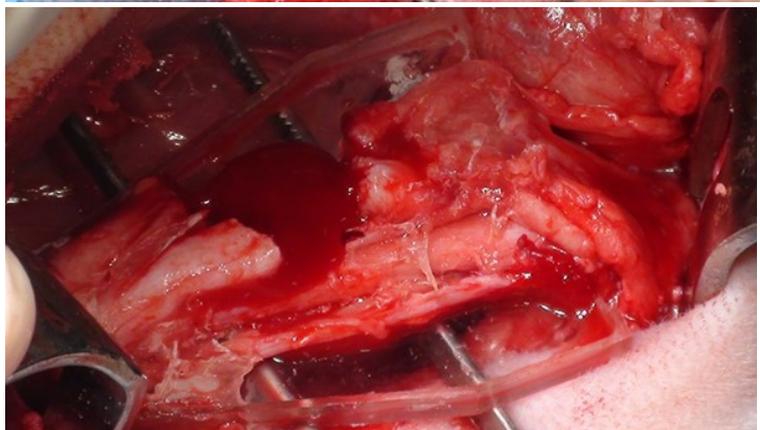


Fig 16. Sanguinamento del nervo in seguito alla lesione.

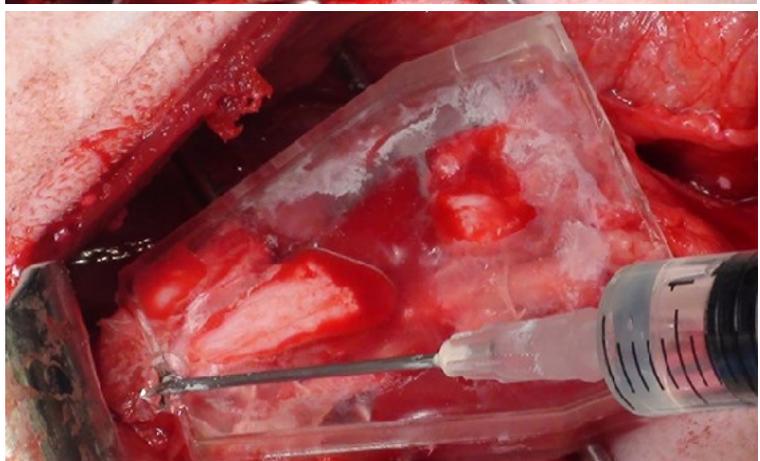


Fig 17. Chiusura Neurobox.

Dott.ssa Maria Letizia Guida
Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.
Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

TRATTAMENTO POST-OPERATORIO

Durante il risveglio, tutti gli animali sono stati alloggiati in un locale dedicato; tutti sono stati sottoposti a trattamento antibiotico con Amoxicillina-Acido Clavulanico a 20 mg/kg SID per 7 giorni, Meloxicam a 0,2 mg/kg SID per 5 giorni e nelle prime 24 ore il dolore è stato gestito con Metadone (Semfortane 10mg/ml) 0,2 mg/kg ogni 4 ore e successivamente con Buprenorfina a 20µg/kg ogni 8 ore.

Sono stati registrati: tempo di recupero della stazione, complicanze a breve (entro le 24 ore) e a lungo termine (entro 30 giorni). Gli animali sono stati sottoposti ad esame clinico completo ed esame neurologico settimanale per il primo mese e successivamente quindicinale per tutto il periodo dello studio.

Gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia dopo 10 e 32 settimane. Si è proceduto al recupero del dispositivo e all'esame macro e microscopico della parte. I campioni sono stati sottoposti ad esame istologico in Ematossilina-Eosina e mediante Immunoistochimica in seguito ad inclusione in paraffina e colorazione con anti-corpo anti-MBP (Myelin Basic Protein).

4.3.2 RISULTATI

I tempi chirurgici sono variati da un tempo minimo di 50 minuti ad uno massimo di 120 minuti con una media di 72 minuti (71,87min).

Nei 7 capi veniva effettuata la lesione dei fasci di origine dei nn. Radiale, Mediano e Ascellare. Il capo 406 ha ricevuto la sezione dei fasci dei nn. Radiale, Mediano, Ascellare, Ulnare e Muscolo-cutaneo.

Non sono state registrate rilevanti complicanze intra operatorie, ma solo una lieve emorragia a carico di un vaso del nervo ascellare (pecora n. 402), e una stimolazione algica nel momento della tomia (pecora n. 401). Nelle tabelle 6 e 7 sono riassunti i dati relativi ai soggetti, al trattamento chirurgico, alla gestione post-operatoria e ai tempi di soppressione.

Esaminando singolarmente i soggetti:

401: Il soggetto ha recuperato la stazione dopo 48 ore dall'intervento chirurgico. Assenza di sindrome di Horner. Durante tutto il periodo di studio il paziente ha presentato: stazione tripodale con mancato appoggio dell'arto interessato, progressiva contrattura muscolotendinea, in particolare a carico delle articolazioni del carpo e di quella metacarpo-falangea con mancato appoggio dell'arto al terreno. L'esame neurologico dell'arto lesionato si è reso nel tempo difficilmente valutabile per la contrattura muscolare. A 10 settimane post-chirurgia si è osservato: animale in ottime condizioni generali, l'esame ortopedico particolare dell'arto eseguito in decubito laterale ha rivelato importante atrofia della muscolatura della spalla, modica contrattura dei tendini flessori del carpo e del piede. All'esame dell'andatura si è osservato: tentativo di movimento dell'arto anteriore evidenziabile dalla contrazione dei muscoli della spalla, movimento di avanzamento del braccio, assenza di contrazione del muscolo Tricipite e di movimenti attivi di estensione del gomito, del carpo e delle articolazioni falangee, che venivano tenute flesse impedendo l'appoggio dell'arto al terreno.

L'esame neurologico ha evidenziato la presenza di nocicezione a carico di entrambe le dita, della cute della regione metacarpea, del gomito e del braccio, sia sulla faccia dorsale sia su quella volare. Non si è osservata nocicezione sulla regione tricipitale e sulle porzioni anteriore e mediale del braccio. Esame istologico in corso.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

402: il soggetto ha recuperato la stazione dopo 30 minuti dalla fine dell'intervento chirurgico. Assenza di sindrome di Horner. Durante tutto il periodo di studio il paziente ha presentato: stazione tripodale con mancato appoggio dell'arto interessato, progressiva contrattura muscolotendinea, in particolare a carico delle articolazioni carpica e metacarpo-falangea che impediva l'appoggio dell'arto al terreno.

A 32 settimane post-chirurgia si è osservato: animale in ottime condizioni generali, l'esame ortopedico particolare dell'arto eseguito in decubito laterale ha evidenziato atrofia della muscolatura della spalla con contrattura muscolare a carico di braccio e avambraccio. All'esame dell'andatura: colpo di testa, contrazione dei muscoli della spalla con modico avanzamento del braccio con l'arto mantenuto costantemente flesso sotto il tronco. L'esame neurologico ha evidenziato nocicezione a carico delle dita mediale e laterale, della regione laterale dell'avambraccio, mediale e laterale del braccio e della spalla. La nocicezione della regione mediale del metacarpo è risultata assente sino al terzo medio di radio-ulna. Si è osservata la flessione del carpo alla stimolazione algica delle dita.

L'esame elettromiografico, eseguito a 12 settimane post-chirurgia ha evidenziato: assenza di attività distalmente alla lesione ($\leq 0,8$ mAmp, soglia normale rilevata su arto sano), presenza di twitch muscolare prossimale alla lesione con stimolazione maggiore (2,2 mAmp) a carico dei muscoli prossimali dell'arto.

Esame istologico in corso.

403: in seguito alla chirurgia il soggetto ha presentato decubito laterale permanente e complicanze riconducibili a polmonite *ab ingestis* con esito fatale nelle 24 ore successive all'intervento.

L'animale è stato escluso dallo studio.

404: il soggetto ha presentato un rapido recupero della stazione tripodale (30 minuti post-chirurgia). Assenza di sindrome di Horner. Nei giorni

successivi è stato osservato un graduale peggioramento della condizione clinica con riduzione dell'appetito, riduzione fino all'interruzione dell'attività ruminale, decubito sternale permanente. Date le gravi condizioni cliniche non responsive alle terapie sintomatiche l'animale è stato sottoposto ad eutanasia dopo 6 settimane dalla chirurgia ed è stato escluso dallo studio.

405: il soggetto ha recuperato la stazione dopo 48 ore dalla chirurgia. Assenza di sindrome di Horner. Durante tutto il periodo di studio ha presentato stazione tripodale con l'arto mantenuto passivamente appoggiato sul dorso del piede. All'8° settimana l'esame dell'andatura ha evidenziato: arto trattato con lieve appoggio al terreno sul dorso del piede, colpo di testa, contrazione dei muscoli della spalla per l'avanzamento del braccio, modica flessione del gomito, del carpo e dell'articolazione metacarpo-falangea. L'esame neurologico ha evidenziato la presenza di nocicezione a carico di entrambe le dita, della cute della regione metacarpea, del gomito e del braccio, sia sulla faccia dorsale sia su quella volare. Non si è osservata presenza di nocicezione a livello della regione tricipitale, della porzione anteriore e mediale del braccio e della regione ascellare.

A 10 settimane post-chirurgia, l'animale presentava diminuzione del BCS, tosse grassa, scolo nasale (esame coprologico negativo, sintomi trattati con terapia antibiotica per 10 giorni e FANS per 5 giorni). L'animale è deceduto improvvisamente dopo 12 settimane per cui è stato escluso dallo studio.

406: il soggetto non ha mai presentato recupero della stazione. Assenza di sindrome di Horner. L'esame ortopedico ha evidenziato algia dell'articolazione coxo-femorale bilaterale non responsiva al trattamento con FANS. A causa del progressivo peggioramento di tutti gli arti, l'animale è stato sottoposto ad eutanasia dopo 10 settimane ed è stato escluso dallo studio.

407: il soggetto ha recuperato la stazione tripodale dopo 30 minuti circa dalla fine della chirurgia. Assenza di sindrome di Horner. L'ovino ha mostrato un progressivo miglioramento della capacità di passare dal decubito sternale alla stazione. Dopo 32 settimane ha presentato un ottimo stato generale e l'arto trattato veniva mantenuto esteso con carico del peso sul dorso del piede (Fig. 18). Non si è osservata contrattura muscolo-tendinea fatta eccezione per una di grado lieve a carico dell'articolazione metacarpo-falangea. Si osservava una lieve riduzione del tono muscolare della regione scapolare e una moderata contrattura dei tendini flessori delle dita. Durante la locomozione l'ovino ha mostrato una chiara capacità di estensione del gomito e del carpo e di flessione del gomito. L'esame neurologico ha mostrato: presenza di riflesso flessorio con maggiore flessione del gomito e minore del carpo; nocicezione delle dita laterali e mediali; nocicezione della cute dell'arto.



Fig 18. Ovino 407 a 32 settimane dalla chirurgia.

L'esame istologico ha evidenziato la presenza di tessuto fibroso in quantità cospicue all'esterno della neuroguida: si tratta di tessuto fibroso, con tralci di fibre collagene, ricco di fibroblasti e con abbondanti vasi (tagliati prevalentemente in piano longitudinale) (Fig 19).

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

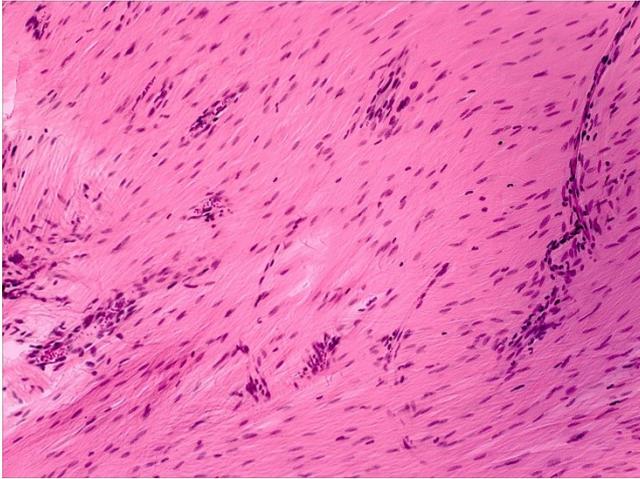


Fig. 19. Membrana esterna al neurobox. Tessuto fibroso (si vedono i tralci di fibre collagene), ricco di fibroblasti e con abbondanti vasi (tagliati prevalentemente in piano longitudinale). (ematossilina/eosina)

All'interno della neuroguida si sono osservati fenomeni rigenerativi neuronali: nelle zone di rigenerazione sono presenti fibre nervose e cellule di Schwann molto ravvicinate, come ci si aspetta in un rigenerato nervoso dove la distanza tra gli internodi è minore. Vi sono anche fibroblasti e collagene, ma in proporzione modesta (Fig. 20); sicuramente non si osserva massiva reazione cicatriziale che impedirebbe la riconnessione prossimo-distale. La presenza di questi contingenti in rigenerazione viene evidenziata dall'immunoistochimica che mostra in rosso la Myelin Basic Protein ed in blu i nuclei cellulari (Fig. 21).

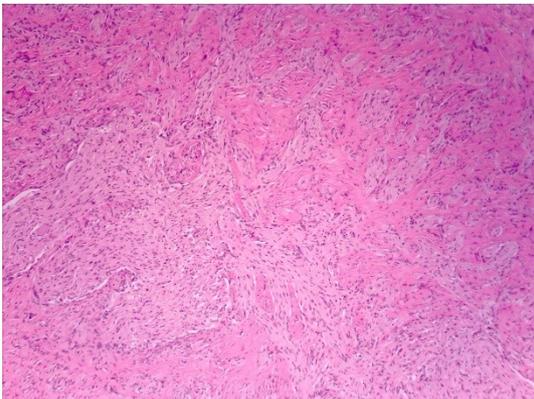


Fig. 20 (Ematossilina/eosina)

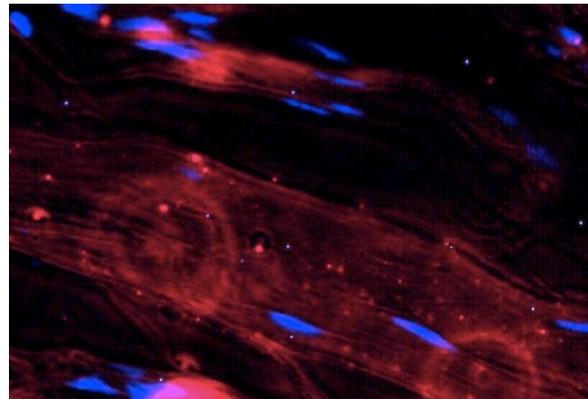


Fig.21 Immunoistochimica

Nella zona del rigenerato si apprezzano contingenti di fibre nervose caratterizzate da una distanza internodale breve (Fig.22). Nella zona non lesionata sono ben differenziate le fibre nervose integre con una inferiore

densità di cellule di Schwann, e distanza internodale ampia, fisiologica (Fig. 23).

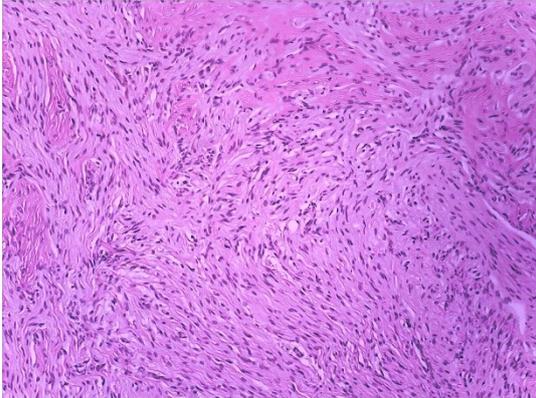


Fig. 22 Ematossilina eosina

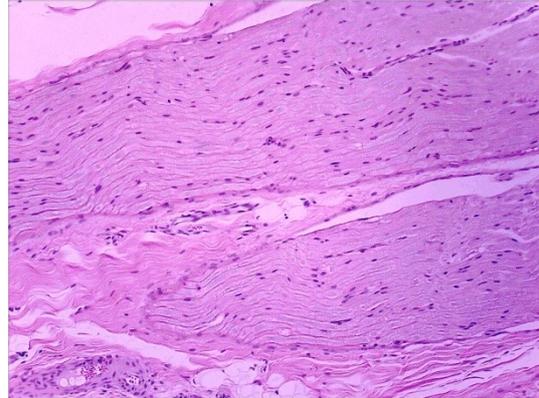


Fig.23 Ematossilina eosina

L'immunoistochimica consente di distinguere tra fibre nervose mieliniche e fibre nervose amieliniche o fibre collagene, soprattutto quando si sovrappone il quadro in microscopia in contrasto di fase, che aggiunge la morfologia delle fibre in oggetto (vi sono 3 spot di artefatti riconoscibili dalla forma circolare nella parte sinistra della foto) (Fig. 24 a/b). Il quadro osservato è compatibile con un neuroma in continuità; tuttavia sono presenti ben distinti contingenti di fibre in senso prossimo-distale.

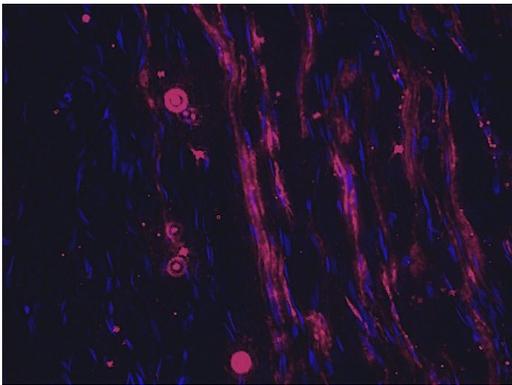


Fig. 24 a. Immunoistochimica: si distinguono fibre nervose mieliniche (rosso; parte destra della foto) e fibre nervose amieliniche o fibre collagene (parte sinistra).

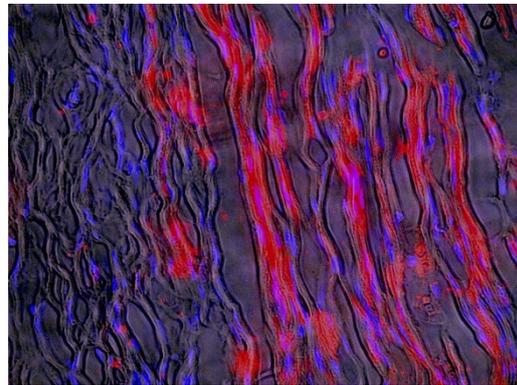


Fig 24 b. Stesso quadro dell'immagine 22a in microscopia in contrasto di fase.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

I campioni sono stati colorati inoltre con anti-corpo anti-MBP (Myelin Basic Protein), costituente fondamentale della mielina, presente in circa il 30% in massa che rappresenta la proteina che tiene insieme la membrana cellulare appiattita, dal versante citoplasmatico (figure da 25 a 29).

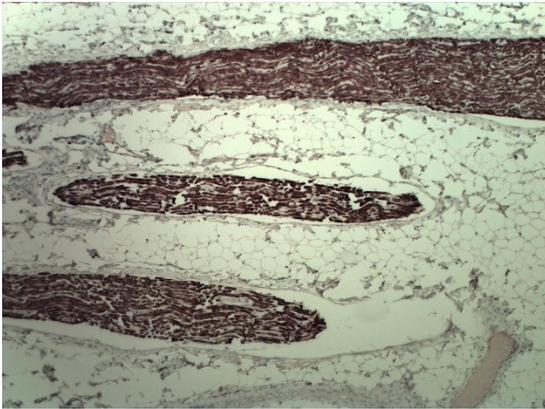


Fig. 25. Si distinguono molto bene i fasci prossimali alla lesione. Essi non sono stati interessati dalla lesione chirurgica. Si presentano quindi ben strutturati, di notevole spessore, ben delimitati da perinevrio ed epinevrio in una compagine di tessuto adiposo perineurale.

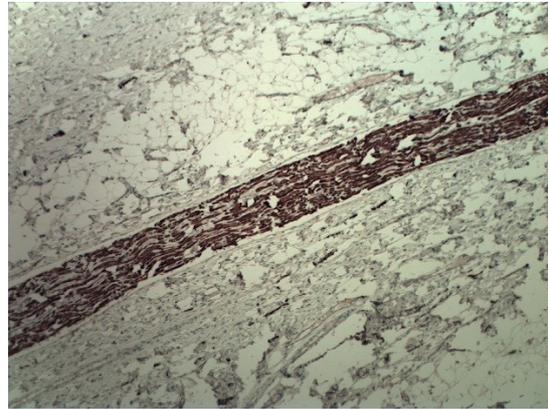


Fig 26. Fascio intatto al confine della zona lesionale. Si distingue bene l'elongazione delle fibre nervose (colorate in marrone) dalle fibre collagene (blu tenue) e dai vasi sanguigni. Tutte e tre queste strutture mantengono una stessa elongazione.

Questo quadro si sovrappone a quanto già illustrato nella figura 21 e nella figura 23.

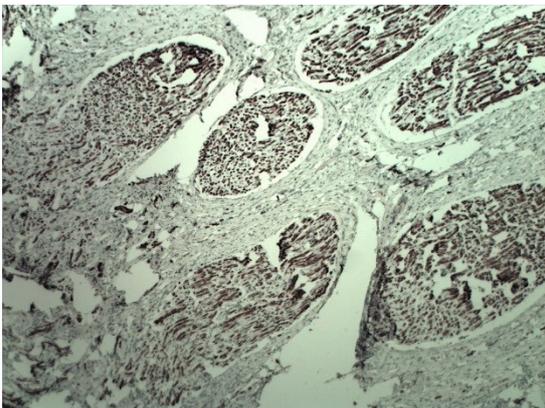


Fig. 27. Zona di passaggio dalla compagine dei fascicoli nervosi a quella del rigenerato. Si vede come le fibre nervose tendano a distribuirsi in maniera allargata nel rigenerato.

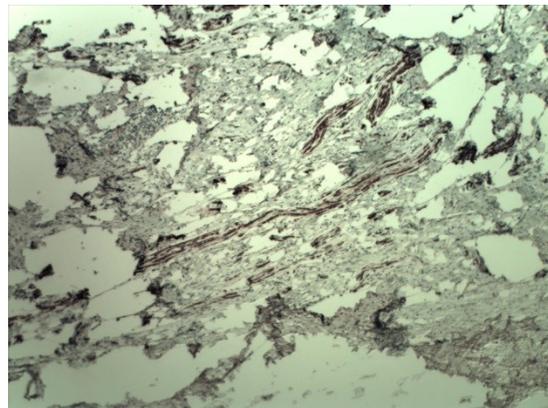


Fig. 28. Nella zona del rigenerato nervoso si notano fibre, anche isolate, che mantengono un orientamento prossimo-distale, ma in questo caso la proliferazione fibroblastica sembra predominante.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

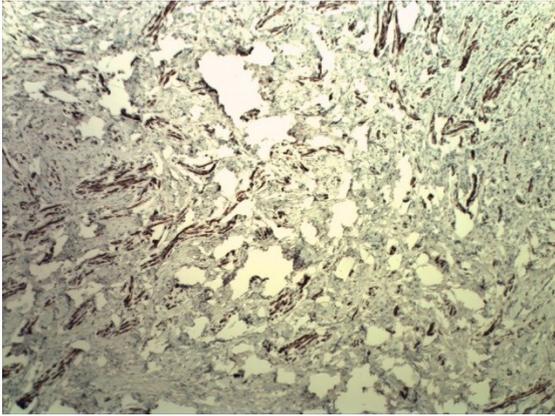


Fig. 29. La marcatura con Abcam62631 mostra come nella zona di rigenerazione nervosa si evidenzino nettamente fibre orientate in direzione prossimo-distale seppur in presenza di altri vari orientamenti.

Fig. 25 – 29 :

Anticorpo: Abcam Ab62631 (Abcam, Cambridge, UK).

Ingrandimento 50 (5X10).

Prossimale a destra della foto.

Comune a tutti i quadri del rigenerato è l'assenza di una franca reazione avversa che abbia portato alla creazione di una barriera cicatriziale tra monconi prossimali e distali. Come già visto, la reazione cicatriziale si estrinseca principalmente all'esterno del Neurobox.

408: Ha presentato recupero della stazione dopo 48 ore dall'intervento chirurgico, mantenendo l'arto operato appoggiato sul dorso del piede. Assenza di sindrome di Horner. Durante il periodo di osservazione il capo ha presentato una graduale e progressiva contrattura muscolo-tendinea che alla 32° settimana è esitata in una anchilosi articolare in flessione delle articolazioni di spalla, gomito e carpo, con l'arto mantenuto adeso alla parete toracica. Non si è osservata contrattura dei tendini flessori delle dita e l'articolazione metacarpo-falangea veniva mantenuta estesa. Si è resa evidente inoltre una importante e severa atrofia della muscolatura della spalla.

L'esame neurologico ha evidenziato presenza di nocicezione a carico della porzione dorsale del dito laterale, della regione craniale dell'omero e della cute caudale alla spina scapolare. Si è osservata assenza di nocicezione a carico del dito mediale e della regione mediale del metacarpo fino al terzo medio di radio-ulna e a livello della regione ascellare.

Esame istologico in corso.

ID ovino	peso	Data chirurgia	Lato operato	Tronchi nervosi resecati	Complicanze intra op	Durata chirurgia
401	35,5	27/04	sn	Ascellare Radiale Mediano	stimolazione algica durante la tomia	55
402	47,5	26/04	sx	Ascellare Mediano Radiale	Cauterizzato vaso del nervo ascellare	70
403	25	27/04	sn	Radiale e mediano. (sacrificato l'Ascellare per mancanza di spazio nel dispositivo)	0	50
404	44	26/04	sn	Ascellare Radiale Mediano	0	75
405	44	26/04	dx	Ascellare Radiale Mediano	0	55
406	47,5	27/04	sn	Ascellare Radiale Mediano, Ulnare e Muscolocutaneo	0	70
407	40	22/04	dx	Ascellare Radiale Mediano	0	120
408	35	22/04	sn	Ascellare Radiale Mediano	0	80

Tab 6. Tabella riassuntiva del trattamento chirurgico

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

	Tempo di recupero della stazione	Fisioterapia		Complicanze	Tempo di soppressione
		Movimenti passivi	Pallone		
401	48 h	No	no		10 settimane
402	30 minuti post risveglio	No	no		32 settimane
403	nessuno	No	no		Deceduta 24 h post op
404	30 minuti postop	Si	Si	Dopo iniziale recupero, decubito permanente	6 settimane
405	48 h	Si	si	Respiratorie	Deceduta 12 settimane
406	nessuno	Si	Si	Decubito permanente	10 settimane
407	2 h	No	no		32 settimane
408	48 h	No	no		32 settimane

Tab 7. Tabella riassuntiva dei trattamenti post-operatori

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di verificare l'utilità del modello sperimentale ovino per lo studio della rigenerazione del nervo.

Il presente studio rappresenta una fase di un progetto in corso già da diversi anni presso la sezione di Chirurgia del nostro Dipartimento in collaborazione con i Dipartimenti di Medicina e Chirurgia di Sassari e dell'Università Cattolica di Roma.

In caso di neuropraxia di 1° e 2° la guarigione può essere completa senza alcun intervento chirurgico in un periodo compreso tra 1 settimana e 4 mesi poiché la velocità di rigenerazione è di 1 mm al giorno. In caso di axonotmesi o neurotmesi è necessaria la ricostruzione chirurgica. Il gold standard è la ricostruzione diretta con l'apposizione dei due monconi tramite microsuture epineurali. La sutura dei due monconi deve avvenire senza alcuna tensione in un letto ben vascolarizzato. In caso di axonotmesi ci si aspetta una guarigione lenta e incompleta nell'arco di 12 mesi oppure, se solo l'epinervio è intatto, la formazione di un neuroma in continuità (Houschyar, 2016). La principale complicanza deriva dalla possibilità, sempre presente a prescindere dalla dimensione del gap esistente, che del tessuto cicatriziale che possa formarsi tra i due monconi rendendo impossibile la ricongiunzione del tessuto nervoso.

Quando la ricostruzione diretta non è possibile, per la presenza di tensione tra i due monconi e la perdita di sostanza è ampia, è indicato l'impiego di un trapianto autologo di nervo. In questo caso l'ideale è prelevare un nervo con diametro simile e con le stesse caratteristiche motorie/sensoriali. Tuttavia, l'uso di innesti autologhi ha alcuni svantaggi quali la necessità di un secondo sito chirurgico per la raccolta del nervo donatore che può avere significativa comorbilità, la perdita della funzione del nervo donatore, il nervo donatore

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

potrebbe essere rappresentato da un nervo sensibile più piccolo che limita il recupero completo quando a richiedere il trattamento è un nervo motore più grande e più importante; una quantità limitata di nervi donatori e una crescente difficoltà nel proporre un autotrapianto a pazienti che non accettano il sacrificio dei loro nervi, la morbilità associata, la mancanza di garanzia di successo e infine i punti di sutura utilizzati per fissare il nervo trapiantato potrebbero rappresentare il sito di una proliferazione fibroblastica sfavorevole.

Sono più di 20 anni che le guide nervose artificiali sono state introdotte nella pratica clinica come valida alternativa al trapianto autologo. Si tratta fondamentalmente di condotti cilindrici all'interno dei quali i monconi di un nervo lesionato possano trovare una protezione e una guida.

Gli studi degli ultimi decenni hanno portato allo sviluppo di diversi condotti bioassorbibili approvati dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) e dalla Conformità Europea (CE).

Le neuroguide si dimostrano efficaci quanto il trapianto autologo per lesioni con gap compreso nei 20 mm, trovano indicazione per la ricostruzione di nervi di piccolo calibro con gap ≤ 30 mm, oppure di nervi con calibro maggiore con gap ≤ 50 mm. In questa situazione la neuroguida offre il vantaggio di evitare il sacrificio del nervo donatore, la morbilità legata alla resezione nel sito donatore, fornendo al tempo stesso una semplice e rapida ricostruzione chirurgica (Houschyar, 2016).

Per una rigenerazione ottimale del nervo, una guida nervosa dovrebbe rispecchiare il più possibile le caratteristiche fisiche e meccaniche del nervo naturale mantenendo una certa biocompatibilità.

Una strategia emergente consiste nell'utilizzo di fillers luminali che agiscono come scaffold all'interno delle guide nervose per incrementare la ricrescita del neurite e la proliferazione delle cellule di Schwann. Consiste nell'incorporazione di uno o più fattori di crescita aggiuntivi o cellule accessorie che aiutino il processo di rigenerazione in una matrice luminale.

Il gruppo di ricerca di Roma ha messo a punto nel 2006 una neuroguida "Neurobox" (brevetto WO/2008/029373), a doppia valva, non degradabile,

rigida e che non necessita di punti di sutura al moncone del nervo, permettendo invece la chiusura con colle di cianoacrilato. Il Neurobox è stato utilizzato su lesioni sperimentali del nervo sciatico nel ratto Wistar. I risultati hanno mostrato la presenza di una capsula fibrotica esterna alla camera di rigenerazione, la presenza all'interno di sottile tessuto vascolare e di fibre nervose mielinizzate e non, in rigenerazione. L'uso della colla non ha determinato insulto al tessuto nervoso, né alterazioni del fenomeno rigenerativo. (Merolli, 2009).

A differenza delle guide tubulari in cui è necessario manipolare e a volte distendere o tirare i monconi per un corretto posizionamento, il Neurobox, grazie alla sua foggia bivalve, consente di accogliere comodamente i monconi del nervo limitando i danni derivanti dalla trazione. Non necessita di sutura poiché i monconi vengono mantenuti *in situ* dalla colla. L'uso della sutura può determinare tensione sui monconi creando uno stimolo infiammatorio responsabile della produzione di fibroblasti e miofibroblasti che non favoriscono la rigenerazione del tessuto nervoso. La rigidità del dispositivo offre una protezione meccanica alle fibre nervose in rigenerazione soprattutto nelle prime fasi quando il tessuto è molto fragile. Per quest'ultimo motivo trova applicazione clinica in caso di lesioni vicine a strutture scheletriche rigide (diafisarie) e non per lesioni in corrispondenza di segmenti articolari. Il sistema è aperto alle estremità per favorire la penetrazione di elementi cellulari e vasi sanguigni necessari per sostenere la rigenerazione. Una camera di rigenerazione piatta e ampia sembra permettere una migliore vascolarizzazione dei monconi favorendo lo sviluppo di una rete vascolare attorno ad essi. Il dispositivo offre alle fibre nervose ampio spazio permettendo l'inserimento di altri elementi quali fattori di crescita aggiuntivi e/o cellule staminali.

L'utilizzo della colla di cianoacrilato è stata associata in passato a sviluppo di dermatite allergica da contatto e asma (Merolli, 2010). Inoltre, in casi sporadici, l'utilizzo dell'etil-2-cianoacrilato è stato correlato con lo sviluppo di neuropatia, ma potrebbero essere coinvolti altri fattori come l'utilizzo di grandi quantità e/o esposizione prolungata. Come gruppo di molecole

adesive che polimerizzano rapidamente, i cianoacrilati hanno trovato diverse applicazioni chirurgiche come nelle suture di ferite cutanee, o come agenti emostatici ed embolizzanti. In una più recente letteratura sono stati riportati risultati promettenti con le molecole di cianoacrilato nella chirurgia nervosa, in particolare: l'etil-2-cianoacrilato; il n-butyl-2-cianoacrilato e l' N-2-ottil-cianoacrilato. Questi studi dimostrano che le colle di cianoacrilato possono essere utilizzate in diretto contatto con il nervo (Merolli, 2010).

Sulla base dei risultati positivi ottenuti sul ratto, il gruppo di ricerca ha proseguito lo studio applicando la neuroguida su un modello animale più grande e con caratteristiche anatomiche più vicine a quelle dell'uomo.

I modelli animali sono stati per decenni il cardine della ricerca e continuano ad essere necessari per l'approvazione e regolamentazione dell'utilizzo clinico di biomateriali sviluppati su modelli *in vitro*. La scelta della specie animale rappresenta un momento molto delicato nella definizione del progetto di ricerca poiché la selezione inadeguata può determinare, a fronte di metodiche chirurgiche e istologiche di elevato livello specialistico, l'ottenimento di dati che non possono essere traslati in medicina umana rendendo quindi non comparabili i risultati e in conclusione inutile la sperimentazione.

L'ovino presenta alcuni elementi che lo rendono un buon modello animale per questa tipologia di studio: l'assenza della clavicola, la topografia del plesso brachiale e le notevoli dimensioni del campo operatorio (60+/-10 mm per lato) molto simili a quelle dell'uomo (Merolli, 2016). Il plesso brachiale appare facilmente raggiungibile con ridotto danno tissutale poiché, mancando la clavicola, è sufficiente eseguire l'incisione cutanea e del muscolo pellicciaio sottostante e la retrazione dorso-caudale della scapola per ottenere un semplice e ampio accesso alla regione oggetto di studio. L'ovino inoltre è una specie, facilmente reperibile, poco costosa, di semplice management. Peraltro è stata già utilizzata come modello animale sperimentale per lo studio delle lesioni del plesso brachiale di origine ostetrica (Fullarton, 2001).

Lo studio preliminare ci ha permesso di affermare che la procedura chirurgica fosse ripetibile ed eseguibile in sicurezza. Ci ha consentito di individuare le dimensioni ideali del dispositivo in rapporto alla razza Sarda da noi utilizzata e come il Neurobox fosse ben tollerato, sia a livello sistemico che locale. Lo studio pilota tuttavia ha messo in evidenza che l'esecuzione di una lesione completa del plesso determina una pleora di difficoltà meccaniche che esitano nell'incapacità dell'animale di raggiungere la stazione quadrupedale e quindi di sopportare questo tipo di sperimentazione nel rispetto delle norme del benessere animale. Per questo motivo si è proceduto con l'esecuzione di una lesione parziale che, preservando una limitata attività motoria dell'arto, avrebbe permesso all'animale un rapido recupero della stazione. Il movimento dell'arto avrebbe inoltre favorito la stimolazione continua delle regioni denervate aiutando la rigenerazione, ostacolando, o comunque rallentando, la contrattura fibrotica secondaria al disuso.

Nello studio sperimentale non sono state registrate rilevanti complicanze intra-operatorie in nessuno degli 8 capi. La tecnica chirurgica messa a punto nello studio pilota è stata considerata di semplice realizzazione e rapida. Non è stato osservato alcun segno riferibile a complicanze a breve termine, quali edema, tumefazione, algia o infezione correlabili a reazioni locali o sistemiche per la presenza del Neurobox.

Quattro animali sono stati esclusi dal lavoro: due sono deceduti per complicanze polmonari (403-405), due sono stati sottoposti ad eutanasia per incapacità di recupero della stazione quadrupedale. Si trattava del capo 406, sottoposto a lesione completa, che non ha mai recuperato la stazione. È nostra opinione che nell'ovino, a causa della peculiarità della sequenza di movimenti messi in atto per raggiungere la stazione quadrupedale, sia sostanziale preservare l'attività dei muscoli estensori e flessori del carpo; pertanto la lesione completa delle strutture nervose non è consigliabile in questo modello animale.

Il capo 404, dopo un repentino recupero della stazione a seguito della chirurgia, ha mostrato segni riferibili a patologia articolare degenerativa del bipede posteriore non responsivo al trattamento con farmaci anti infiammatori e fisioterapia. È possibile pertanto che a seguito di un maggior carico sugli altri arti si sia reso evidente uno stato patologico non diagnosticato in occasione dell'esame clinico di reclutamento. Sottolineiamo quindi l'importanza di reclutare soggetti giovani ed esenti da patologie muscolo scheletriche per la realizzazione di studi di questo tipo.

Quattro animali hanno recuperato rapidamente la stazione (401- 402- 407- 408) e hanno completato tutto lo studio sperimentale.

Tutti i capi hanno mostrato una ottima tolleranza alla lesione sperimentale, conservando le normali attività comportamentali tipiche della specie.

I capi 401- 402- 408 sin dall'inizio non hanno utilizzato l'arto operato assumendo la stazione tripodale per tutta la durata dello studio. Questo ha determinato una prevalenza dei fenomeni di contrattura muscolo-tendinea, nonostante i tentativi fisioterapici messi in atto. L'ovino, animale preda e gregario, mal prestandosi alla manipolazione da parte dell'uomo, non solo non trae giovamento dalla fisioterapia, ma naturalmente tenta di contrastarla.

Dal punto di vista clinico il soggetto 407 ha presentato nelle 32 settimane di osservazione post-chirurgica un'evoluzione molto interessante, caratterizzata dal graduale recupero dell'attività motoria volontaria e dall'assenza di fenomeni di contrattura muscolo tendinea. Alla 20° settimana, durante la locomozione, mostrava movimenti volontari di avanzamento della porzione prossimale dell'arto (spalla e gomito), mentre non si osservavano movimenti volontari delle articolazioni distali al carpo e l'arto veniva mantenuto poggiato sul dorso. Alla 32° settimana durante la locomozione l'ovino mostrava una chiara capacità ad estendere le articolazioni di gomito e carpo e a flettere il gomito. Il soggetto durante l'andatura presentava un leggero carico sull'arto operato, seppure con un appoggio sul dorso del piede.

A differenza degli altri 3 capi, che a seguito della lesione sperimentale hanno mostrato una attività locomotoria tripodale, con arto flessa sotto il tronco e

conseguente contrattura muscolo-tendinea, il 407 ha manifestato un progressivo miglioramento. Sin dall'inizio ha mostrato un parziale uso dell'arto che gli ha permesso un appoggio quadrupedale. In questa maniera non è stato necessario eseguire fisioterapia poiché con il movimento volontario è stato preservato il tono muscolare e la mobilità articolare.

L'esame EMG eseguito, per motivi tecnici, su un solo capo (402) ha mostrato l'assenza di stimolazione distale compatibile con un quadro di denervazione e presenza di twitch muscolare prossimale alla lesione. Quest'ultimo reperto è stato registrato dopo incremento dell'amperaggio e potrebbe essere compatibile con "cross-talk" oppure con "sprouting". Il "cross-talk" deriva dalla diffusione del segnale in direzione prossimale con coinvolgimento di altre fibre, mentre lo "sprouting" indicherebbe il passaggio di segnale attraverso tralci di fibre nervose in rigenerazione in sede di lesione.

Nel complesso l'esame EMG ha evidenziato due aspetti: assenza di passaggio di segnale distalmente alla lesione e diffusione del segnale in senso retrogrado, che potrebbe derivare o da rigenerazione neuronale o da reclutamento di altre fibre.

In tutti i capi, l'esame macroscopico ha evidenziato la presenza di una capsula fibrosa che avvolgeva completamente la parte esterna della neuroguida ad eccezione dei due poli di ingresso e uscita delle radici nervose. Quest'ultimo dato, osservato anche negli studi condotti sul ratto (Merolli, 2010) riveste un ruolo molto importante perché la guida ha proprio il compito di proteggere le fibre nervose dai fenomeni di cicatrizzazione di tipo fibrotico che ostacolano la rigenerazione del tessuto nervoso.

L'esame istologico ha evidenziato nel complesso la prevalenza di fenomeni rigenerativi del tessuto nervoso rispetto alla formazione di tessuto cicatriziale. I fenomeni rigenerativi del tessuto nervoso sono caratterizzati dalla presenza di fibre nervose e cellule di Schwann molto ravvicinate, come ci si aspetta in un rigenerato nervoso, dove la distanza tra gli internodi è minore. All'interno della neuroguida si osservano fibroblasti e collagene, ma in proporzione modesta; sicuramente non si nota una massiva reazione

cicatrizziale che impedirebbe la riconnessione prossimo-distale. Il quadro ricorda quello di un neuroma in continuità anche se tuttavia sono presenti ben distinti contingenti di fibre in senso prossimo-distale. Interessante il dato che il tessuto cicatrizziale non invada i fori di entrata e di uscita delle neuroguida, fori destinati all'ingresso e fuoriuscita di vasi sanguigni e fattori di crescita.

Lo studio sperimentale presenta diversi limiti. Il primo è di natura burocratica. La realizzazione del progetto, infatti, è potuta avvenire in tempi lontani dalla iniziale progettazione a causa della lunga attesa legata all'ottenimento del permesso Ministeriale, arrivato dopo 18 mesi dall'inizio delle procedure burocratiche. Solo in quel momento è stato possibile mettere a punto la fase pratica di reclutamento degli animali, preparazione e realizzazione del progetto, per cui il Dottorando responsabile del seguente progetto ha avuto a disposizione solo 18 mesi per raccogliere i risultati.

Sarebbe stato sicuramente più rappresentativo utilizzare un numero maggiore di soggetti prevedendo inoltre dei tempi di osservazione più lunghi (almeno 18-24 mesi) ed avvalendosi di metodi elettrodiagnostici eseguiti in maniera seriale (EMG, potenziali evocati) per osservare l'evoluzione della guarigione nervosa tramite metodi oggettivi e ripetibili. Da sottolineare che non è noto con esattezza il tempo di rigenerazione di tali nervi in questa specie, per cui il nostro studio potrebbe rappresentare solamente un punto di partenza.

Ancora, in sede chirurgica è stato possibile osservare una notevole variabilità individuale nell'anatomia del plesso, difficoltà che ha richiesto la modifica del piano iniziale su base individuale.

La complessità dell'attuazione di protocolli fisioterapici nella specie oggetto dello studio ha purtroppo determinato in alcuni casi l'insorgenza di fenomeni degenerativi muscolo-tendinei a carico degli arti che hanno condotto ad uno scadimento delle condizioni generali e reso difficile la valutazione neurologica a fine studio.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, il Neurobox sembra mostrare interessanti potenzialità applicative, ma è necessario proseguire lo studio con un numero maggiore di casi e per tempi più lunghi.

L'ovino sembra costituire un buon modello sperimentale di traslazione per l'uomo e considerando l'importanza sociale e sanitaria di queste lesioni nell'uomo è auspicabile proseguire gli studi in questo settore. Per superare le difficoltà incontrate in questa specie nell'eseguire protocolli fisioterapici, sarebbe auspicabile creare una lesione sperimentale che possa preservare maggiormente l'attività motoria volontaria e il tono muscolare favorendo così l'azione neurotrofica del movimento stesso.

BIBLIOGRAFIA

- Aebischer, P., Valentini, R. F., Dario, P., Domenici, C., & Galletti, P. M. (1987). Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Research*, 436(1), 165-168.
- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(5), 383-394.
- Alessandrino, F., Pagani, C., & Draghi, F. (2014). In-continuity neuroma of the median nerve at the elbow. *Journal of ultrasound*, 17(3), 229-231.
- Alge, D. L., Zhou, D., Adams, L. L., Wyss, B. K., Shadday, M. D., Woods, E. J., ... & Goebel, W. S. (2010). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4(1), 73-81.
- Ali, Z. S., Bakar, D., Li, Y. R., Judd, A., Patel, H., Zager, E. L., ... & Stein, S. C. (2014). Utility of delayed surgical repair of neonatal brachial plexus palsy: Clinical article. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 13(4), 462-470.
- Allison, D. D., & Grande-Allen, K. J. (2006). Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue engineering*, 12(8), 2131-2140.
- Allodi, I., Udina, E., & Navarro, X. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Progress in neurobiology*, 98(1), 16-37.
- Amoh, Y., Aki, R., Hamada, Y., Niiyama, S., Eshima, K., Kawahara, K., ... & Katsuoka, K. (2012). Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *The Journal of dermatology*, 39(1), 33-38.
- Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S., & Hoffman, R. M. (2005). Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17734-17738.
- Andrews, M. R., & Stelzner, D. J. (2004). Modification of the regenerative response of dorsal column axons by olfactory ensheathing cells or peripheral axotomy in adult rat. *Experimental neurology*, 190(2), 311-327.
- Archibald, S. J., Krarup, C., Shefner, J., Li, S. T., & Madison, R. D. (1991). A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: An electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *Journal of Comparative Neurology*, 306(4), 685-696.
- Archibald, S. J., Shefner, J., Krarup, C., & Madison, R. D. (1995). Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *Journal of Neuroscience*, 15(5), 4109-4123.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

- Ashley Jr, W. W., Weatherly, T., & Park, T. S. (2006). Collagen nerve guides for surgical repair of brachial plexus birth injury. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 105(6), 452-456.
- Askari, N., Yaghoobi, M. M., Shamsara, M., & Esmaeili-Mahani, S. (2015). Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neuroscience*, 305, 197-208.
- Barone, R. (2012). Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Vol. 7 Neurologia. Pag. 151, 176-185, 191. *Bologna: Edagricole*.
- Barras, F. M., Pasche, P., Bouche, N., Aebischer, P., & Zurn, A. D. (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *Journal of neuroscience research*, 70(6), 746-755.
- Belkas, J. S., Munro, C. A., Shoichet, M. S., & Midha, R. (2005 b). Peripheral nerve regeneration through a synthetic hydrogel nerve tube. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 23(1), 19-29.
- Belkas, J. S., Munro, C. A., Shoichet, M. S., Johnston, M., & Midha, R. (2005 a). Long-term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) nerve conduits. *Biomaterials*, 26(14), 1741-1749.
- Bernardini, M. (2002). *Neurologia del cane e del gatto*. Poletto.
- Bertleff, M. J., Meek, M. F., & Nicolai, J. P. A. (2005). A prospective clinical evaluation of biodegradable neurolac nerve guides for sensory nerve repair in the hand. *The Journal of hand surgery*, 30(3), 513-518.
- Biernaskie, J. A., McKenzie, I. A., Toma, J. G., & Miller, F. D. (2006). Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nature protocols*, 1(6), 2803-2812.
- Birch, R. (2014). Traumatic Lesions of the Brachial Plexus. In *European Surgical Orthopaedics and Traumatology* (pp. 891-923). Springer Berlin Heidelberg.
- Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (2003). Cellular GDNF delivery promotes growth of motor and dorsal column sensory axons after partial and complete spinal cord transections and induces remyelination. *Journal of Comparative Neurology*, 467(3), 403-417.
- Bongso, A., Fong, C. Y., & Gauthaman, K. (2008). Taking stem cells to the clinic: major challenges. *Journal of cellular biochemistry*, 105(6), 1352-1360.
- Bora, F. W., Bednar, J. M., Osterman, A. L., Brown, M. J., & Sumner, A. J. (1987). Prosthetic nerve grafts: a resorbable tube as an alternative to autogenous nerve grafting. *The journal of hand surgery*, 12(5), 685-692.

- Borkenhagen, M., Stoll, R. C., Neuenschwander, P., Suter, U. W., & Aebischer, P. (1998). In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. *Biomaterials*, *19*(23), 2155-2165.
- Boyd, J. G., & Gordon, T. (2003). Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Experimental neurology*, *183*(2), 610-619.
- Boyd, J. G., & Gordon, T. (2003). Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Molecular neurobiology*, *27*(3), 277-323.
- Braga-Silva, J. (1999). The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *Journal of Hand Surgery*, *24*(6), 703-706.
- Bryan, D. J., Holway, A. H., Wang, K. K., Silva, A. E., Trantolo, D. J., Wise, D., & Summerhayes, I. C. (2000). Influence of glial growth factor and Schwann cells in a bioresorbable guidance channel on peripheral nerve regeneration. *Tissue engineering*, *6*(2), 129-138.
- Bryan, D. J., Tang, J. B., Holway, A. H., Rieger-Christ, K. M., Trantolo, D. J., Wise, D. L., & Summerhayes, I. C. (2003). Enhanced peripheral nerve regeneration elicited by cell-mediated events delivered via a bioresorbable PLGA guide. *Journal of reconstructive microsurgery*, *19*(02), 125-134.
- Campbell, W. W. (2008). Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical neurophysiology*, *119*(9), 1951-1965.
- Carrier-Ruiz, A., Evaristo-Mendonça, F., Mendez-Otero, R., & Ribeiro-Resende, V. T. (2015). Biological behavior of mesenchymal stem cells on poly-ε-caprolactone filaments and a strategy for tissue engineering of segments of the peripheral nerves. *Stem cell research & therapy*, *6*(1), 128.
- Cheng, F. C., Tai, M. H., Sheu, M. L., Chen, C. J., Yang, D. Y., Su, H. L., ... & Pan, H. C. (2010). Enhancement of regeneration with glia cell line-derived neurotrophic factor-transduced human amniotic fluid mesenchymal stem cells after sciatic nerve crush injury [RETRACTED] Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*, *112*(4), 868-879.
- Chew, S. Y., Mi, R., Hoke, A., & Leong, K. W. (2007). Aligned Protein-Polymer Composite Fibers Enhance Nerve Regeneration: A Potential Tissue-Engineering Platform. *Advanced functional materials*, *17*(8), 1288-1296.
- Chiono, V., & Tonda-Turo, C. (2015). Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. *Progress in neurobiology*, *131*, 87-104.
- Chiu, D. T. (1999). Autogenous venous nerve conduits. A review. *Hand clinics*, *15*(4), 667-71.

- Cordeiro, P. G., Seckel, B. R., Lipton, S. A., D'amore, P. A., Wagner, J., & Madison, R. (1989). Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plastic and reconstructive surgery*, 83(6), 1013-1019.
- Crouzier, T., McClendon, T., Tosun, Z., & McFetridge, P. S. (2009). Inverted human umbilical arteries with tunable wall thicknesses for nerve regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89(3), 818-828.
- Cuevas, P., Carceller, F., Dujovny, M., Garcia-Gómez, I., Cuevas, B. A., González-Corrochano, R. & Reimers, D. (2002). Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurological research*, 24(7), 634-638.
- Cui, L., Jiang, J., Wei, L., Zhou, X., Fraser, J. L., Snider, B. J., & Yu, S. P. (2008). Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem cells*, 26(5), 1356-1365.
- Dalton, P. D., Flynn, L., & Shoichet, M. S. (2002). Manufacture of poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels. *Biomaterials*, 23(18), 3843-3851.
- Deasy, B. M., Gharaibeh, B. M., Pollett, J. B., Jones, M. M., Lucas, M. A., Kanda, Y., & Huard, J. (2005). Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Molecular biology of the cell*, 16(7), 3323-3333.
- Dellon, A. L. (1993). A numerical grading scale for peripheral nerve function. *Journal of Hand Therapy*, 6(2), 152-160.
- Dellon, A. L., & Mackinnon, S. E. (1988). An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plastic and reconstructive surgery*, 82(5), 849-856.
- Dombrowski, M. A., Sasaki, M., Lankford, K. L., Kocsis, J. D., & Radtke, C. (2006). Myelination and nodal formation of regenerated peripheral nerve fibers following transplantation of acutely prepared olfactory ensheathing cells. *Brain research*, 1125(1), 1-8.
- Dubuisson, A. S., & Kline, D. G. (2002). Brachial plexus injury: a survey of 100 consecutive cases from a single service. *Neurosurgery*, 51(3), 673-683.
- Dumont, C. E., & Hentz, V. R. (1997). Enhancement of axon growth by detergent-extracted nerve grafts. *Transplantation*, 63(9), 1210-1215.
- Engels, P. E., Tresp, M., Kingham, P. J., di Summa, P. G., Largo, R. D., Schaefer, D. J., & Kalbermatten, D. F. (2013). Harvest site influences the growth properties of adipose derived stem cells. *Cytotechnology*, 65(3), 437-445.
- Eser, F., Aktekin, L. A., Bodur, H., & Atan, C. (2009). Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurology India*, 57(4), 434.
- Evans, G. R. D., Brandt, K., Widmer, M. S., Lu, L., Meszlenyi, R. K., Gupta, P. K., & Nabawi, A. (1999). In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 20(12), 1109-1115.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

- Evans, G. R., Brandt, K., Niederbichler, A. D., Chauvin, P., Hermann, S., Bogle, M., & Patrick, C. W. (2000). Clinical long-term in vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(8), 869-878.
- Evans, P. J., Midha, R., & Mackinnon, S. E. (1994). The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Progress in neurobiology*, 43(3), 187-233.
- Fairbairn, N. G., Randolph, M. A., & Redmond, R. W. (2014). The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 67(5), 662-675.
- Fansa, H., Schneider, W., Wolf, G., & Keilhoff, G. (2002). Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts. *Muscle & nerve*, 26(1), 87-93.
- Faroni, A., Mobasser, S. A., Kingham, P. J., & Reid, A. J. (2015). Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Advanced drug delivery reviews*, 82, 160-167.
- Faroni, A., Smith, R. J., Lu, L., & Reid, A. J. (2016). Human Schwann-like cells derived from adipose-derived mesenchymal stem cells rapidly de-differentiate in the absence of stimulating medium. *European Journal of Neuroscience*, 43(3), 417-430.
- Fine, E. G., Decosterd, I., Papaliozios, M., Zurn, A. D., & Aebischer, P. (2002). GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *European Journal of Neuroscience*, 15(4), 589-601.
- Fine, E. G., Valentini, R. F., Bellamkonda, R., & Aebischer, P. (1991). Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials*, 12(8), 775-780.
- Fu, Y. S., Cheng, Y. C., Lin, M. Y. A., Cheng, H., Chu, P. M., Chou, S. C., ... & Sung, M. S. (2006). Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem cells*, 24(1), 115-124.
- Fullarton, A. C., Myles, L. M., Lenihan, D. V., Hems, T. E. J., & Glasb, M. A. (2001). Obstetric brachial plexus palsy: a comparison of the degree of recovery after repair of a C6 ventral root avulsion in newborn and adult sheep. *British journal of plastic surgery*, 54(8), 697-704.
- Geuna, S., Tos, P., Battiston, B., & Giacobini-Robecchi, M. G. (2004). Bridging peripheral nerve defects with muscle-vein combined guides. *Neurological research*, 26(2), 139-144.
- Gilbert, A. (Ed.). (2001). *Brachial Plexus Injuries: Published in Association with the Federation Societies for Surgery of the Hand*. CRC Press.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

- Gimble, J. M., Bunnell, B. A., Frazier, T., Rowan, B., Shah, F., Thomas-Porch, C., & Wu, X. (2013). Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*, 9(1), 3-10.
- Govoni, V. M., Rahal, S. C., Agostinho, F. S., Conceição, R. T., Tsunemi, M. H., & El-Warrak, A. O. (2012). Goniometric measurements of the forelimb and hindlimb joints in sheep. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology (VCOT)*, 25(4), 297-300.
- Griffith, L. G. (2002). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1), 83-95.
- Grimoldi, N., Colleoni, F., Tiberio, F., Vetrano, I. G., Cappellari, A., Costa, A., ... & Pluderi, M. (2015). Stem cell salvage of injured peripheral nerve. *Cell transplantation*, 24(2), 213-222.
- Grinsell, D., & Keating, C. P. (2014). Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. *BioMed research international*, 2014.
- Gu, X., Ding, F., & Williams, D. F. (2014). Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 35(24), 6143-6156.
- Hadlock, T. A., Sundback, C. A., Hunter, D. A., Vacanti, J. P., & Cheney, M. L. (2001). A new artificial nerve graft containing rolled Schwann cell monolayers. *Microsurgery*, 21(3), 96-101.
- He, C., Chen, Z., & Chen, Z. (1992). Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery*, 13(3), 151-154.
- Hei, W. H., Kim, S., Park, J. C., Seo, Y. K., Kim, S. M., Jahng, J. W., & Lee, J. H. (2016). Schwann-like cells differentiated from human dental pulp stem cells combined with a pulsed electromagnetic field can improve peripheral nerve regeneration. *Bioelectromagnetics*, 37(3), 163-174.
- Heine, W., Conant, K., Griffin, J. W., & Höke, A. (2004). Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves. *Experimental neurology*, 189(2), 231-240.
- Hirasawa, Y., & Sakakida, K. (1983). Sports and peripheral nerve injury. *The American journal of sports medicine*, 11(6), 420-426.
- Hobson, M. I. (2002). Increased vascularisation enhances axonal regeneration within an acellular nerve conduit. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 84(1), 47.
- Houschyar, K. S., Momeni, A., Pyles, M. N., Cha, J. Y., Maan, Z. N., Duscher, D., & Schoonhoven, J. V. (2016). The role of current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Plastic surgery international*, 2016.
- Hsu, S. H., Chang, C. J., Tang, C. M., & Lin, F. T. (2004). In vitro and in vivo effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 on seeded Schwann cells within poly (DL-lactic acid-

- co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of biomaterials applications*, 19(2), 163-182.
- Hu, X., Huang, X., Yang, Q., Wang, L., Sun, J., Zhan, H., ... & Xiang, M. (2015). Safety and efficacy of intracoronary hypoxia-preconditioned bone marrow mononuclear cell administration for acute myocardial infarction patients: The CHINA-AMI randomized controlled trial. *International journal of cardiology*, 184, 446-451.
 - Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function 1. *Annual review of neuroscience*, 24(1), 677-736.
 - Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D., & Cloutier, J. F. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annual review of neuroscience*, 26(1), 509-563.
 - Hudson, T. W., Evans, G. R., & Schmidt, C. E. (1999). Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clinics in plastic surgery*, 26(4), 617-28.
 - Hudson, T. W., Zawko, S., Deister, C., Lundy, S., Hu, C. Y., Lee, K., & Schmidt, C. E. (2004). Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue engineering*, 10(11-12), 1641-1651.
 - Ide, C., Osawa, T., & Tohyama, K. (1990). Nerve regeneration through allogeneic nerve grafts, with special reference to the role of the Schwann cell basal lamina. *Progress in neurobiology*, 34(1), 1-38.
 - Inada, Y., Morimoto, S., Takakura, Y., & Nakamura, T. (2004). Regeneration of peripheral nerve gaps with a polyglycolic acid-collagen tube. *Neurosurgery*, 55(3), 640-648.
 - Jiang, L., Jones, S., & Jia, X. (2017). Stem Cell Transplantation for Peripheral Nerve Regeneration: Current Options and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 94.
 - Jiang, T., Kumbar, S. G., Nair, L. S. & Laurencin, C. T. (2008). Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(4), 354-364.
 - Jiang, X., Lim, S. H., Mao, H. Q., & Chew, S. Y. (2010). Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. *Experimental neurology*, 223(1), 86-101.
 - Joannides, A., Gaughwin, P., Schwiening, C., Majed, H., Sterling, J., Compston, A., & Chandran, S. (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *The Lancet*, 364(9429), 172-178.
 - Johnson, T. S., O'neill, A. C., Motarjem, P. M., Nazzal, J., Randolph, M., & Winograd, J. M. (2008). Tumor formation following murine neural precursor cell transplantation in a rat peripheral nerve injury model. *Journal of reconstructive microsurgery*, 24(08), 545-550.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

- Jones, D. M., Tucker, B. A., Rahimtula, M., & Mearow, K. M. (2003). The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. *Journal of neurochemistry*, 86(5), 1116-1128.
- Jones, S., Eisenberg, H. M., & Jia, X. (2016). Advances and future applications of augmented peripheral nerve regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1494.
- Katayama, Y., Montenegro, R., Freier, T., Midha, R., Belkas, J. S., & Shoichet, M. S. (2006). Coil-reinforced hydrogel tubes promote nerve regeneration equivalent to that of nerve autografts. *Biomaterials*, 27(3), 505-518.
- Kemp, S. W., Cederna, P. S., & Midha, R. (2017). Comparative outcome measures in peripheral regeneration studies. *Experimental neurology*, 287, 348-357.
- Khuong, H. T., Kumar, R., Senjaya, F., Grochmal, J., Ivanovic, A., Shakhbazou, A., ... & Midha, R. (2014). Skin derived precursor Schwann cells improve behavioral recovery for acute and delayed nerve repair. *Experimental neurology*, 254, 168-179.
- Klein, S. M., Vykoukal, J., Li, D. P., Pan, H. L., Zeitler, K., Alt, E., ... & Prantl, L. (2016). Peripheral Motor and Sensory Nerve Conduction following Transplantation of Undifferentiated Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells in a Biodegradable US Food and Drug Administration-Approved Nerve Conduit. *Plastic and reconstructive surgery*, 138(1), 132-139.
- Konofaos, P., & Ver Halen, J. P. (2013). Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *Journal of reconstructive microsurgery*, 29(03), 149-164.
- Kouyoumdjian, J. A. (2006). Peripheral nerve injuries: a retrospective survey of 456 cases. *Muscle & nerve*, 34(6), 785-788.
- Krekoski, C. A., Neubauer, D., Zuo, J., & Muir, D. (2001). Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 6206-6213.
- Kretschmer, T., Antoniadis, G., Braun, V., Rath, S. A., & Richter, H. P. (2001). Evaluation of iatrogenic lesions in 722 surgically treated cases of peripheral nerve trauma. *Journal of neurosurgery*, 94(6), 905-912.
- Kumar, A. A., Kumar, S. R., Narayanan, R., Arul, K., & Baskaran, M. (2009). Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury: a phase I/II clinical safety and primary efficacy data. *Exp Clin Transplant*, 7(4), 241-248.
- Lee, A. C., Vivian, M. Y., Lowe, J. B., Brenner, M. J., Hunter, D. A., Mackinnon, S. E., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2003). Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Experimental neurology*, 184(1), 295-303.

- Lee, D. C., Chen, J. H., Hsu, T. Y., Chang, L. H., Chang, H., Chi, Y. H., & Chiu, M. (2017). Neural stem cells promote nerve regeneration through IL12-induced Schwann cell differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 79, 1-11.
- Lietz, M., Dreesmann, L., Hoss, M., Oberhoffner, S., & Schlosshauer, B. (2006). Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials*, 27(8), 1425-1436.
- Lin C.J., Jiang, J., Wei, L., Zhou, X., Fraser, J. L., Snider, B. J., & Yu, S. P. (2008). Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem cells*, 26(5), 1356-1365.
- Lin, H., Liu, F., Zhang, C., Zhang, Z., Guo, J., Ren, C., & Kong, Z. (2009). Pluripotent hair follicle neural crest stem-cell-derived neurons and schwann cells functionally repair sciatic nerves in rats. *Molecular neurobiology*, 40(3), 216.
- Lohmeyer, J., Zimmermann, S., Sommer, B., Machens, H. G., Lange, T., & Mailänder, P. (2007). Bridging peripheral nerve defects by means of nerve conduits. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, 78(2), 142-147.
- Mackinnon and A. L. Dellon, "Nerve repair and nerve grafts," in *Surgery of the Peripheral Nerve*, S. E. Mackinnon, Ed., Thieme, New York, NY, USA, 1988.
- Mackinnon, S. E., & Dellon, A. L. (1990). A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. *Journal of reconstructive microsurgery*, 6(02), 117-121.
- Mackinnon, S. E., Dellon, A. L., Hudson, A. R., & Hunter, D. A. (1984). Chronic Nerve Compression-an Experimental Model in the Rat. *Annals of plastic surgery*, 13(2), 112-120.
- Mackinnon, S. E., Dellon, A. L., Lundborg, G., Hudson, A. R., & Hunter, D. A. (1986). A study of neurotrophism in a primate model. *The Journal of hand surgery*, 11(6), 888-894.
- Malafaya, P. B., Silva, G. A., & Reis, R. L. (2007). Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4), 207-233.
- Marchesi, C., Pluderi, M., Colleoni, F., Belicchi, M., Meregalli, M., Farini, A. & Porretti, L. (2007). Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia*, 55(4), 425-438.
- Maricević, A., & Erceg, M. (1997). War injuries to the extremities. *Military medicine*, 162(12), 808-811.
- Martens, W., Sanen, K., Georgiou, M., Struys, T., Bronckaers, A., Ameloot, M., ... & Lambrechts, I. (2014). Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann

- cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *The FASEB Journal*, 28(4), 1634-1643.
- Matsumoto, K., Ohnishi, K., Kiyotani, T., Sekine, T., Ueda, H., Nakamura, T., ... & Shimizu, Y. (2000). Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain research*, 868(2), 315-328.
 - Matsuse, D., Kitada, M., Kohama, M., Nishikawa, K., Makinoshima, H., Wakao, S. & Umezawa, A. (2010). Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 69(9), 973-985.
 - McKenzie, I. A., Biernaskie, J., Toma, J. G., Midha, R., & Miller, F. D. (2006). Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *Journal of Neuroscience*, 26(24), 6651-6660.
 - Meek, M. F., & Coert, J. H. (2008). US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Annals of plastic surgery*, 60(1), 110-116.
 - Merle, M., Lee Dellon, A., Campbell, J. N., & Chang, P. S. (1989). Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. *Microsurgery*, 10(2), 130-133.
 - Merolli A, Manunta M, Verardi C, Manunta A and Sanna Passino E (2016). Artificially-assisted nerve-regeneration in brachial plexus lesions can be better studied in the ovine animal model. Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress.
 - Merolli, A., & Joyce, T. J. (Eds.). (2009). Biomaterials in hand surgery, Cap 9. Springer.
 - Merolli, A., Marceddu, S., Rocchi, L., & Catalano, F.. (2010). In vivo study of ethyl-2-cyanoacrylate applied in direct contact with nerves regenerating in a novel nerve-guide. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(6), 1979-1987.
 - Merolli, A., Masciangelo, M. A. R. C. O., Morini, A., Mingarelli, L., De Vitis, R., Militerno, A., & Rocchi, L. (2011). La rigenerazione dei nervi periferici mediante guide neurali artificiali: l'applicazione clinica e la ricerca sperimentale. *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia*, 37.
 - Merolli, A., Rocchi, L., Catalano, F., Planell, J., Engel, E., Martínez, E., ... & Tranquilli Leali, P. (2009). In vivo regeneration of rat sciatic nerve in a double-halved stitchless guide: A pilot-study. *Microsurgery*, 29(4), 310-318.

- Merolli, A., Rocchi, L., Mingarelli, L., & Morini, A. (2014). A Second-look At Nerve Regeneration By Artificial Nerve-guides In Human Upper Limb. *The International Journal of Artificial Organs*, 37(8), 588.
- Merolli, A., Rocchi, L., Wang, X. M., & Cui, F. Z. (2014). Peripheral nerve regeneration inside collagen-based artificial nerve guides in humans. *J Appl Biomater Funct Mater. doi*, 10, 5301.
- Midha, R., Munro, C. A., Dalton, P. D., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2003). Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *Journal of neurosurgery*, 99(3), 555-565.
- Miller, M. E., Christensen, G. C., & Evans, H. E. (1965). Anatomy of the Dog. *Academic Medicine*, 40(4), 400.
- Mohanna, P. N., Terenghi, G., & Wiberg, M. (2005). Composite PHB-GGF conduit for long nerve gap repair: a long-term evaluation. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, 39(3), 129-137.
- Mokry, J., Karbanová, J., Lukáš, J., Palečková, V., & Dvořánková, B. (2000). Biocompatibility of HEMA Copolymers Designed for Treatment of CNS Diseases with Polymer-Encapsulated Cells. *Biotechnology progress*, 16(5), 897-904.
- Mosahebi, A., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2003). Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue engineering*, 9(2), 209-218.
- Mosahebi, A., Woodward, B., Wiberg, M., Martin, R., & Terenghi, G. (2001). Retroviral labeling of Schwann cells: in vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration. *Glia*, 34(1), 8-17.
- Muheremu, A., & Ao, Q. (2015). Past, present, and future of nerve conduits in the treatment of peripheral nerve injury. *BioMed research international*, 2015.
- Muir, D. (2010). The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair. *Experimental neurology*, 223(1), 102-111.
- Murakami, T., Fujimoto, Y., Yasunaga, Y., Ishida, O., Tanaka, N., Ikuta, Y., & Ochi, M. (2003). Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain research*, 974(1), 17-24.
- Navissano, M., Malan, F., Carnino, R., & Battiston, B. (2005). Neurotube® for facial nerve repair. *Microsurgery*, 25(4), 268-271.
- Nectow, A. R., Marra, K. G., & Kaplan, D. L. (2011). Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(1), 40-50.
- Neubauer, D., Graham, J. B., & Muir, D. (2007). Chondroitinase treatment increases the effective length of acellular nerve grafts. *Experimental neurology*, 207(1), 163-170.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

- Nie, X., Zhang, Y. J., Tian, W. D., Jiang, M., Dong, R., Chen, J. W., & Jin, Y. (2007). Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 36(1), 32-38.
- Nijhuis, T. H., Bodar, C. W., Van Neck, J. W., Walbeehm, E. T., Siemionow, M., Madajka, M., ... & Hovius, S. E. (2013). Natural conduits for bridging a 15-mm nerve defect: comparison of the vein supported by muscle and bone marrow stromal cells with a nerve autograft. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 66(2), 251-259.
- Nilsson, A., Dahlin, L., Lundborg, G., & Kanje, M. (2005). Graft repair of a peripheral nerve without the sacrifice of a healthy donor nerve by the use of acutely dissociated autologous Schwann cells. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery*, 39(1), 1-6.
- Nucci, A. M. (2014). La rigenerazione nervosa periferica: odierni orientamenti e prospettive future. Tesi di laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia. Università degli studi di Pisa.
- Ohta, M., Suzuki, Y., Chou, H., Ishikawa, N., Suzuki, S., Tanihara, M., ... & Ide, C. (2004). Novel heparin/alginate gel combined with basic fibroblast growth factor promotes nerve regeneration in rat sciatic nerve. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71(4), 661-668.
- Pabari, A., Yang, S. Y., Mosahebi, A., & Seifalian, A. M. (2011). Recent advances in artificial nerve conduit design: strategies for the delivery of luminal fillers. *Journal of controlled release*, 156(1), 2-10.
- Pabari, A., Yang, S. Y., Seifalian, A. M., & Mosahebi, A. (2010). Modern surgical management of peripheral nerve gap. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63(12), 1941-1948.
- Panseri, S., Cunha, C., Lowery, J., Del Carro, U., Taraballi, F., Amadio, S., ... & Gelain, F. (2008). Electrospun micro-and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. *Bmc Biotechnology*, 8(1), 39.
- Pateman, C. J., Harding, A. J., Glen, A., Taylor, C. S., Christmas, C. R., Robinson, P. P., ... & Haycock, J. W. (2015). Nerve guides manufactured from photocurable polymers to aid peripheral nerve repair. *Biomaterials*, 49, 77-89.
- Peng, J., Wang, Y., Zhang, L., Zhao, B., Zhao, Z., Chen, J., ... & Lu, S. (2011). Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain research bulletin*, 84(3), 235-243.
- Phillips, J. B., Bunting, S. C., Hall, S. M., & Brown, R. A. (2005). Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue engineering*, 11(9-10), 1611-1617.

- Plant, G. W., Chirila, T. V., & Harvey, A. R. (1998). Implantation of collagen IV/poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels containing Schwann cells into the lesioned rat optic tract. *Cell transplantation*, 7(4), 381-391.
- Poggetti, A. (2013). Superfici nanostrutturate e rigenerazione del sistema nervoso periferico: studio sperimentale. Tesi di Specializzazione in Ortopedia e traumatologia. Università degli studi di Pisa.
- Radtke, C., Allmeling, C., Waldmann, K. H., Reimers, K., Thies, K., Schenk, H. C., ... & Vogt, P. M. (2011). Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep. *PloS one*, 6(2), e16990.
- Raheja, A., Suri, V., Suri, A., Sarkar, C., Srivastava, A., Mohanty, S., ... & Kalaivani, M. (2012). Dose-dependent facilitation of peripheral nerve regeneration by bone marrow-derived mononuclear cells: a randomized controlled study: Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*, 117(6), 1170-1181.
- Raimondo, S., Nicolino, S., Tos, P., Battiston, B., Giacobini-Robecchi, M. G., Perroteau, I., & Geuna, S. (2005). Schwann cell behavior after nerve repair by means of tissue-engineered muscle-vein combined guides. *Journal of Comparative Neurology*, 489(2), 249-259.
- Raio, L., Ghezzi, F., Di Naro, E., Gomez, R., Franchi, M., Mazor, M., & Brühwiler, H. (1999). Sonographic measurement of the umbilical cord and fetal anthropometric parameters. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 83(2), 131-135.
- Ramer, L. M., Au, E., Richter, M. W., Liu, J., Tetzlaff, W., & Roskams, A. J. (2004). Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury. *Journal of Comparative Neurology*, 473(1), 1-15.
- Rangappa, N., Romero, A., Nelson, K. D., Eberhart, R. C., & Smith, G. M. (2000). Laminin-coated poly (L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation. *Journal of biomedical materials research*, 51(4), 625-634.
- Ranscht, B. (2000). Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(7), 643-651.
- Ravichandran, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J. R., Mukherjee, S., & Ramakrishna, S. (2010). Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, rsif20100120.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., & Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 12, 4565-4565.
- Robinson, P. H., Van Der Lei, B., Hoppen, H. J., Leenslag, J. W., Pennings, A. J., & Nieuwenhuis, P. (1991). Nerve regeneration through a two-ply biodegradable

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)
Università degli studi di Sassari

- nerve guide in the rat and the influence of ACTH4-9 nerve growth factor. *Microsurgery*, 12(6), 412-419.
- Rodrigo, S. F., van Ramshorst, J., Mann, I., Leong, D. P., Cannegieter, S. C., Al Younis, I., ... & Bax, J. J. (2014). Predictors of response to intramyocardial bone marrow cell treatment in patients with refractory angina and chronic myocardial ischemia. *International journal of cardiology*, 175(3), 539-544.
 - Rovak, J. M., Bishop, D. K., Boxer, L. K., Wood, S. C., Mungara, A. K., & Cederna, P. S. (2005). Peripheral nerve transplantation: the role of chemical acellularization in eliminating allograft antigenicity. *Journal of reconstructive microsurgery*, 21(03), 207-213.
 - Ruijs, A. C., Jaquet, J. B., Kalmijn, S., Giele, H., & Hovius, S. E. (2005). Median and ulnar nerve injuries: a meta-analysis of predictors of motor and sensory recovery after modern microsurgical nerve repair. *Plastic and reconstructive surgery*, 116(2), 484-494.
 - Runge, M. B., Dadsetan, M., Baltrusaitis, J., Knight, A. M., Ruesink, T., Lazcano, E. A., ... & Yaszemski, M. J. (2010). The development of electrically conductive polycaprolactone fumarate–polypyrrole composite materials for nerve regeneration. *Biomaterials*, 31(23), 5916-5926
 - Schlosshauer, B., Dreesmann, L., Schaller, H. E., & Sinis, N. (2006). Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. *Neurosurgery*, 59(4), 740-748.
 - Schlosshauer, B., Müller, E., Schröder, B., Planck, H., & Müller, H. W. (2003). Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain research*, 963(1), 321-326.
 - Schmidt, C. E., Shastri, V. R., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1997). Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 8948-8953.
 - Sinis, N., Schaller, H. E., Becker, S. T., Schlosshauer, B., Doser, M., Roesner, H., & Haerle, M. (2007). Long nerve gaps limit the regenerative potential of bioartificial nerve conduits filled with Schwann cells. *Restorative neurology and neuroscience*, 25(2), 131-141.
 - Smith, R. M., Wiedl, C., Chubb, P., & Greene, C. H. (2004). Role of small intestine submucosa (SIS) as a nerve conduit: preliminary report. *Journal of Investigative Surgery*, 17(6), 339-344.
 - Snyder, E. Y., Deitcher, D. L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweg, E. A., & Cepko, C. L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell*, 68(1), 33-51.
 - Sondell, M., Lundborg, G., & Kanje, M. (1998). Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain research*, 795(1), 44-54.

Dott.ssa Maria Letizia Guida

Impiego del modello animale ovino per la messa a punto di innovativi protocolli terapeutici per il trattamento delle lesioni del nervo periferico.

Scuola di Dottorato in Scienze veterinarie. Indirizzo: Patologia e clinica animale (XXIX CICLO)

Università degli studi di Sassari

- Songer, T. J., & LaPorte, R. E. (2000). Disabilities due to injury in the military. *American journal of preventive medicine*, 18(3), 33-40.
- Sowa, Y., Imura, T., Numajiri, T., Nishino, K., & Fushiki, S. (2011). Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem cells and development*, 21(11), 1852-1862.
- Stanec, S., & Stanec, Z. (1998). Reconstruction of upper-extremity peripheral-nerve injuries with ePTFE conduits. *Journal of reconstructive microsurgery*, 14(04), 227-232.
- Stang, F., Fansa, H., Wolf, G., Reppin, M., & Keilhoff, G. (2005). Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 26(16), 3083-3091.
- Sterne, G. D., Brown, R. A., Green, C. J., & Terenghi, G. (1997). Neurotrophin-3 delivered locally via fibronectin mats enhances peripheral nerve regeneration. *European Journal of Neuroscience*, 9(7), 1388-1396.
- Strauch, B., Rodriguez, D. M., Diaz, J., Yu, H. L., Kaplan, G., & Weinstein, D. E. (2001). Autologous Schwann cells drive regeneration through a 6-cm autogenous venous nerve conduit. *Journal of reconstructive microsurgery*, 17(08), 589-598.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., ... & Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*, 54(3), 132-141.
- Sufan, W., Suzuki, Y., Tanihara, M., Ohnishi, K., Suzuki, K., Endo, K., & Nishimura, Y. (2001). Sciatic nerve regeneration through alginate with tubulation or nontubulation repair in cat. *Journal of neurotrauma*, 18(3), 329-338.
- Suganuma, S., Tada, K., Hayashi, K., Takeuchi, A., Sugimoto, N., Ikeda, K., & Tsuchiya, H. (2013). Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. *Journal of Orthopaedic Science*, 18(1), 145-151.
- Sunderland, S. (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 74(4), 491-516.
- Suzuki, K., Suzuki, Y., Tanihara, M., Ohnishi, K., Hashimoto, T., Endo, K., & Nishimura, Y. (2000). Reconstruction of rat peripheral nerve gap without sutures using freeze-dried alginate gel. *Journal of biomedical materials research*, 49(4), 528-533.
- Suzuki, Y., Tanihara, M., Ohnishi, K., Suzuki, K., Endo, K., & Nishimura, Y. (1999). Cat peripheral nerve regeneration across 50 mm gap repaired with a novel nerve guide composed of freeze-dried alginate gel. *Neuroscience letters*, 259(2), 75-78.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.

- Terris, D. J., Toft, K. M., Moir, M., Lum, J., & Wang, M. (2001). Brain-derived neurotrophic factor–enriched collagen tubule as a substitute for autologous nerve grafts. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 127(3), 294-298.
- Terzis, J. K., & Konofaos, P. (2010). Low-dose FK506 after contralateral C7 transfer to the musculocutaneous nerve using two different tubes: a study in rats. *Annals of plastic surgery*, 64(5), 622-631.
- Tohill, M., & Terenghi, G. (2004). Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnology and applied biochemistry*, 40(1), 17-24.
- Tremp, M., Meyer zu Schwabedissen, M., Kappos, E. A., Engels, P. E., Fischmann, A., Scherberich, A., ... & Kalbermatten, D. F. (2015). The regeneration potential after human and autologous stem cell transplantation in a rat sciatic nerve injury model can be monitored by MRI. *Cell transplantation*, 24(2), 203-211.
- Tsai, M. S., Hwang, S. M., Tsai, Y. L., Cheng, F. C., Lee, J. L., & Chang, Y. J. (2006). Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biology of reproduction*, 74(3), 545-551.
- Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., & Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reproduction*, 19(6), 1450-1456.
- Udina, E., Rodríguez, F. J., Verdú, E., Espejo, M., Gold, B. G., & Navarro, X. (2004). FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic Schwann cells. *Glia*, 47(2), 120-129.
- Valentini, R. F., Vargo, T. G., Gardella, J. A., & Aebischer, P. (1992). Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fibre outgrowth in vitro. *Biomaterials*, 13(3), 183-190.
- Verdú, E., Navarro, X., Gudiño-Cabrera, G., Rodríguez, F. J., Ceballos, D., Valero, A., & Nieto-Sampedro, M. (1999). Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport*, 10(5), 1097-1101.
- Wang, D., Liu, X. L., Zhu, J. K., Jiang, L., Hu, J., Zhang, Y., ... & Yi, J. H. (2008). Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain research*, 1188, 44-53.
- Wang, S., Wan, A. C., Xu, X., Gao, S., Mao, H. Q., Leong, K. W., & Yu, H. (2001). A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly (phosphoester). *Biomaterials*, 22(10), 1157-1169.
- Wang, X., Hu, W., Cao, Y., Yao, J., Wu, J., & Gu, X. (2005). Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain*, 128(8), 1897-1910.

- Wang, Y., Li, Z. W., Luo, M., Li, Y. J., & Zhang, K. Q. (2015). Biological conduits combining bone marrow mesenchymal stem cells and extracellular matrix to treat long-segment sciatic nerve defects. *Neural regeneration research*, 10(6), 965.
- Weber, R. A., Breidenbach, W. C., Brown, R. E., Jabaley, M. E., & Mass, D. P. (2000). A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plastic and reconstructive surgery*, 106(5), 1036-1045.
- Wells, M. R., Kraus, K., Batter, D. K., Blunt, D. G., Weremowitz, J., Lynch, S. E., & Hansson, H. A. (1997). Gel matrix vehicles for growth factor application in nerve gap injuries repaired with tubes: a comparison of biomatrix, collagen, and methylcellulose. *Experimental neurology*, 146(2), 395-402.
- Wewetzer, K., Verdú, E., Angelov, D. N., & Navarro, X. (2002). Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind?. *Cell and tissue research*, 309(3), 337-345.
- Xie, F., Li, Q. F., Gu, B., Liu, K., & Shen, G. X. (2008). In vitro and in vivo evaluation of a biodegradable chitosan–PLA composite peripheral nerve guide conduit material. *Microsurgery*, 28(6), 471-479.
- Xu, X., Yee, W. C., Hwang, P. Y., Yu, H., Wan, A. C., Gao, S., ... & Wang, S. (2003). Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly (phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials*, 24(13), 2405-2412.
- Yamamoto, T., Osako, Y., Ito, M., Murakami, M., Hayashi, Y., Horibe, H., ... & Nakayama, H. (2016). Trophic effects of dental pulp stem cells on schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Cell transplantation*, 25(1), 183-193.
- Yang, D. Y., Sheu, M. L., Su, H. L., Cheng, F. C., Chen, Y. J., Chen, C. J., ... & Pan, H. C. (2012). Dual regeneration of muscle and nerve by intravenous administration of human amniotic fluid–derived mesenchymal stem cells regulated by stromal cell–derived factor-1 α in a sciatic nerve injury model: Laboratory investigation. *Journal of neurosurgery*, 116(6), 1357-1367.
- Yoshii, S., & Oka, M. (2001). Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. *Brain research*, 888(1), 158-162.
- Yoshii, S., Oka, M., Akagi, M., Matsusue, Y., & Nakamura, T. (2001). Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments. *The Journal of hand surgery*, 26(1), 52-59.
- Yu, H., Kumar, S. M., Kossenkov, A. V., Showe, L., & Xu, X. (2010). Stem cells with neural crest characteristics derived from the bulge region of cultured human hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(5), 1227-1236.

- ZARBAKHSH, S., GOUDARZI, N., SHIRMOHAMMADI, M., & SAFARI, M. (2016). Histological study of bone marrow and umbilical cord stromal cell transplantation in regenerating rat peripheral nerve. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(4), 668.
- ZHANG, F., BLAIN, B., BECK, J., ZHANG, J., CHEN, Z., CHEN, Z. W., & LINEAWEAVER, W. C. (2002). Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *Journal of reconstructive microsurgery*, 18(04), 295-300.
- ZHANG, H., WEI, Y. T., TSANG, K. S., SUN, C. R., LI, J., HUANG, H., ... & AN, Y. H. (2008). Implantation of neural stem cells embedded in hyaluronic acid and collagen composite conduit promotes regeneration in a rabbit facial nerve injury model. *Journal of Translational Medicine*, 6(1), 67.
- ZHANG, J., LINEAWEAVER, W. C., OSWALD, T., CHEN, Z., CHEN, Z., & ZHANG, F. (2004). Ciliary neurotrophic factor for acceleration of peripheral nerve regeneration: an experimental study. *Journal of reconstructive microsurgery*, 20(04), 323-327.
- ZIEGLER, L., GRIGORYAN, S., YANG, I. H., THAKOR, N. V., & GOLDSTEIN, R. S. (2011). Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2), 394-403.