

La cicatrice patologica.

Magliacani G, Teich-Alasia S (Eds.).

Napoli: De Nicola editore

1998

Panzica GC, Verzè L, Plumari L, Sechi W, Calcagni M, Stella M, Teich-Alasia S. 1998.
Rigenerazione nervosa in trapianti cutanei dopo lesioni da ustione. In: Magliacani G, Teich-Alasia S(Eds.). La cicatrice patologica. Napoli: De Nicola editore. p 55-64.

**RIGENERAZIONE NERVOSA IN TRAPIANTI CUTANEI DOPO LESIONE DA
USTIONE.**

**GianCarlo Panzica, Laura Verzè, Laura Plumari, Walter Sechi,
Maurizio Calcagni[°], Maurizio Stella[°], Simone Teich-Alasia^{°°}**

Dip. Anatomia, Farmacologia e Medicina legale, Università di Torino

[°]Divisione di Chirurgia Plastica, Centro Grandi Ustionati, CTO, Torino

^{°°}Fondazione Piemontese Studi e Ricerche sulle Ustioni, CTO, Torino

Corrispondenza a:

Prof. GianCarlo PANZICA

Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale

Università degli Studi di Torino

c.so M. D'Azeglio 52

10126 TORINO (Italy)

Tel. 011 6707729

Fax 011 6707732

e-mail: giancarlo.panzica@unito.it

Gli esiti di ustioni estese coinvolgono in diverso grado il sistema nervoso sia a livello centrale sia periferico. Nel primo caso si possono registrare disfunzioni dei principali sistemi di regolazione corporea (osmoregolazione, controllo dell'apparato circolatorio, termoregolazione), mentre nel secondo caso la distruzione più o meno estesa dei nervi periferici può influenzare, anche profondamente, la capacità di recupero funzionale delle regolazioni autonome e della sensibilità. E' noto infatti che, a lungo termine, i pazienti possono soffrire di carenze nella sensibilità discriminativa, iperestesia o disestesia, come pure di insufficienza circolatoria periferica. Tutti questi sintomi sono stati generalmente interpretati come il segnale di una scarsa o assente rigenerazione dopo distruzione dei nervi periferici sottocutanei e dei recettori cutanei (Artz et al., 1979).

Nonostante siano state condotte analisi estesiologiche sul recupero sensitivo dopo ustione e successivo trapianto di cute, sono attualmente molto scarsi gli studi che pongano in relazione il recupero o il deficit funzionale con la distribuzione dei recettori cutanei di senso messi in evidenza con tecniche morfologiche (per un elenco bibliografico completo vedi Iggo e Andres, 1982; Mackinnon e Dellon, 1988, Stella et al., 1988, Panzica et al., 1997). Questa carenza é probabilmente legata alla insufficiente selettività e ripetitività delle tecniche (quali ad esempio le impregnazioni argentiche) che sono state per lungo tempo utilizzate per evidenziare le strutture nervose periferiche. Negli ultimi 10-15 anni le tecniche immunocitochimiche, sia per la loro maggiore sensibilità, sia per la loro specificità, hanno permesso di superare queste limitazioni. Lo sviluppo di queste metodiche ha progressivamente portato alla caratterizzazione di numerosi anticorpi atti ad evidenziare una quantità sempre maggiore di strutture nervose. Fra gli antisieri rivolti contro proteine strutturali maggiormente utilizzati per la rivelazione delle fibre nervose nella cute, sono da citare gli anticorpi contro i neurofilamenti (NF), la proteina gliale S-100, la Neuron Specific Enolase (NSE) e la più recente Protein Gene Product (PGP) 9.5. L'anticorpo contro la proteina S-100 riconosce le cellule di Schwann, mettendo pertanto in evidenza le fibre mieliniche (ma non quelle amieliniche, come ad esempio i terminali intraepiteliali) (Björklund et al., 1986; Haro et al., 1991). Anticorpi contro i neurofilamenti sembrano invece riconoscere solo fibre di origine sensitiva (Karanth et al., 1991; Dalsgaard et al., 1989) ed i neuroni periferici più grandi nei gangli sensitivi ma non quelli più piccoli od i neuroni autonomi (Lawson et al., 1984). Al momento attuale, e sulla base degli studi pubblicati; si può ritenere che la NSE e la PGP 9.5 siano espressi, nell'uomo, nella totalità delle strutture nervose periferiche della cute (Ramieri et al., 1990b, 1992b; Calcagni et al., 1993) e della mucosa gengivale (Ramieri et al., 1990a).

Il nostro gruppo di ricerca si è posto la domanda se l'analisi morfologica di frammenti di cute trapiantata possa essere messa in relazione con le caratteristiche funzionali del trapianto. Infatti, i continui avanzamenti nella tecnica chirurgica permettono ricostruzioni sempre più importanti, con la necessità crescente di fornire coperture con sensibilità il più normale possibile. Questa esigenza ha portato i chirurghi ricostruttori ad interrogarsi su quale sia la copertura ideale, soprattutto per quelle regioni anatomiche con caratteristiche funzionali particolari e fondamentali per la vita di relazione come mani e

pie di. A questo scopo abbiamo messo a punto una serie di protocolli sperimentali per la rivelazione immunostochimica delle strutture nervose nella cute normale (Ramieri et al., 1992b; Calcagni et al., 1993), nella cicatrice da ustione, e nella cute dopo trapianto (Stella et al., 1990, 1994). Lo studio di sezioni seriate trattate per la identificazione immunostochimica di NSE e PGP 9.5 suggerisce che quest'ultima sia presente in un maggior numero di strutture e rappresenti quindi il migliore marker attualmente disponibile (Ramieri et al., 1992a, b). Nella maggioranza dei casi, all'analisi morfologica si è affiancato lo studio con tecniche estesiologiche del recupero funzionale del trapianto.

TECNICHE DI INDAGINE.

Procedure immunostochimiche.

Come già riportato, le tecniche immunostochimiche costituiscono attualmente la metodica più affidabile per lo studio dell'innervazione cutanea ed in particolare delle terminazioni corpuscolate e non. Occorre tuttavia trovare un marker veramente ubiquitario delle strutture nervose periferiche per avere la sicurezza di evidenziare tutte le strutture presenti. Ciò ovviamente è di estrema importanza soprattutto per un approccio quantitativo allo studio della rigenerazione periferica. Come detto in precedenza, sono stati utilizzati diversi markers neurochimici. Studi comparati tra la distribuzione delle strutture nervose osservate con la NSE e con la PGP 9.5 hanno evidenziato come quest'ultimo marker abbia una espressione maggiormente ubiquitaria rispetto alla NSE (Dalsgaard et al., 1989; Ramieri et al., 1990a,b; Wang et al., 1990). Nelle nostre indagini abbiamo quindi sempre utilizzato la evidenziazione immunocitochimica della distribuzione della PGP 9.5.

Le fibre periferiche possono anche essere caratterizzate in base alla presenza di molecole neuroattive quali neurotrasmettitori (acetilcolina, catecolamine) e neuropeptidi. Una disamina completa della loro distribuzione nella cute umana o di altri mammiferi non è mai stata fatta, anche se alcuni lavori hanno affrontato questo argomento in maniera episodica e semiquantitativa (per una rassegna della bibliografia vedi Karanth et al., 1991). Recentemente, allo studio della distribuzione dei citati markers strutturali abbiamo quindi affiancato la ricerca di molecole a significato funzionale quali ad esempio neurotrasmettitori, enzimi, o neuropeptidi. Tra questi abbiamo in particolare studiato la presenza dei peptidi calcitonin-gene related peptide (CGRP) e sostanza P (Panzica et al., 1995; Verzè et al., 1997) e di GAP-43, una proteina ritenuta un *marker* della plasticità neuronale (Verzè et al., 1998).

Le biopsie cutanee sono state raccolte da pazienti adulti consenzienti di entrambi i sessi nel corso di interventi ricostruttivi. I campioni provenivano da cute sana, trapianti conseguenti ad ustione e cicatrici da ustione, essi sono stati rapidamente immersi in fissativo freddo (Zamboni), conservati a +4°C per 12 ore, successivamente lavati in una soluzione di tampone fosfato, sali e saccaroso 15% e congelati. I campioni congelati sono stati conservati a -80°C per un periodo da 2 giorni a parecchi mesi senza notare un apprezzabile calo di immunoreattività. I campioni sono stati sezionati al criostato e le sezioni seriate di 15-30 µm di spessore sono state trattate con i diversi anticorpi primari. Dopo l'incubazione nell'anticorpo primario per 15-18 ore, la presenza di immunoreattività è stata messa in evidenza con il metodo della fluorescenza indiretta, o con il metodo biotina-avidina-perossidasi.

Esame estesiologico.

Prima del prelievo i pazienti affetti da cicatrice o sottoposti a trapianto di cute sono stati sottoposti ad esami estesiologici che includevano i tests di Weber e di Dellon. I risultati clinici di queste valutazioni sono stati presentati secondo lo schema di Highet modificato da Zachary e Holmes (Mackinnon e Dellon, 1988). Un punteggio di S3 o S4 é stato considerato indice di elevata sensibilità, mentre un punteggio di S1 o S2, é stato considerato indice di bassa sensibilità. La tabella 1 riporta i valori di riferimento delle varie classi.

S0: anestesia completa
S1: presenza di sensibilità protettiva profonda, ma assenza di discriminazione dei due punti (S2PD)
S2: S2PD >10 e <15 mm, moving two point discrimination (M2PD) assente
S3: S2PD >6 e <10 mm, M2PD <6 mm, ma presenza di parestesie e/o ipersensibilità
S3+: come S3, ma senza ipersensibilità
S4: sensibilità normale (S2PD <6 mm, M2PD 2 mm)

Tab. 1: Schema di Zachary e Holmes per la classificazione clinica del recupero sensitivo (Mackinnon e Dellon, 1988)

Analisi semiquantitativa e statistica.

Sulle sezione trattate per la rivelazione della presenza di PGP 9.5 é stata condotta un'analisi semiquantitativa considerando la presenza o l'assenza di fibre intraepiteliali (I), recettori sensitivi complessi (C), fibre nervose nelle papille dermiche (P), fibre autonome che innervano i vasi (V) o le ghiandole (G), oppure tronchi nervosi nel derma profondo (D). Questi dati sono stati successivamente raggruppati per ogni caso in modo da fornire un indice della innervazione superficiale (I+C+P) e di quella profonda (V+G+D). La somma di questi due indici é stata considerate un indice della innervazione totale del campione (Stella et al., 1994; Panzica et al., 1997).

STRUTTURE NERVOSE NELLA CUTE SANA.

Markers strutturali

Immunoreattività per la PGP 9.5 é stata messa in evidenza nelle fibre nervose libere del derma e dell'epidermide, e nei corpuscoli sensitivi. Nel derma si possono osservare piccoli fasci nervosi che, in partenza dal sottocutaneo, raggiungono il derma sottopapillare, ove formano il plesso superficiale. Altre fibre penetrano, con un decorso quasi rettilineo ed ortogonale alla superficie, nell'epidermide. Tali fibre intraepiteliali sono messe in evidenza solo dai markers neuronali (PGP 9.5, NSE), mentre non risultano positive per la proteina S-100, ciò conferma implicitamente la mancanza di rivestimento gliale nel loro percorso intraepidermico. Queste fibre intraepidermiche appaiono piccole, varicose e possono essere

identificate fin nello strato granuloso. Esse possono ramificarsi all'interno dell'epidermide ed hanno un percorso generalmente orientato perpendicolarmente alla superficie epiteliale, anche se in alcuni casi possono avere un decorso tortuoso. Numerose fibre libere si possono anche osservare nelle papille dermiche, con frequenti ramificazioni ed avvolgimenti. (Calcagni et al., 1993)

Nello strato basale dell'epidermide possono essere messe in evidenza cellule positive, che sono state in precedenza identificate (nella mucosa gengivale ad esempio) come cellule di Merkel (Ramieri et al., 1992a). Esse sono rotondeggianti o ovalari, possono essere raggruppate in piccoli gruppi o separate e possono presentare contatti con fibre nervose intraepiteliali (complesso di Merkel), oppure essere prive di ogni contatto con le fibre nervose.

Due tipi di complessi recettoriali possono essere visualizzati nelle papille dermiche dopo reazione immunohistochimica per l'evidenziazione della PGP 9.5 o della NSE. Il primo tipo è caratterizzato da un avvolgimento quasi regolare della fibra nervosa, provvisto di numerosi ripiegamenti paralleli alla superficie epiteliale e può essere identificato con i classici corpuscoli di Meissner. Il secondo tipo di recettore è formato da un avvolgimento irregolare, globoso, e la fibra nervosa, parzialmente allargata, può assumere un'andamento a clava. La marcatura con la proteina S-100 dà un'immagine in negativo di questa struttura corpuscolata (Ramieri et al., 1992b).

Infine anche gli annessi cutanei mostrano positività alla PGP 9.5 ed alla NSE. A livello dei bulbi piliferi le fibre costituiscono un reticolo a maglie dense che circonda la parte inferiore, ed assume in seguito, fino al colletto, un andamento verticale (strato a palizzata). Gli adenomeri delle ghiandole sudoripare sono riccamente innervati, mentre più scarsa è l'innervazione delle ghiandole sebacee. Le arteriole e le venule dermiche e sottocutanee sono completamente circondate da sottili fibre varicose.

Immunoreattività per CGRP, SP e GAP-43.

La distribuzione delle fibre peptidergiche a CGRP e a SP nella cute umana è del tutto sovrapponibile a quella rilevata con il marcatore neuronale strutturale, sebbene si presentino molto meno abbondanti. Inoltre, in tutte le aree analizzate le fibre a CGRP sono risultate più abbondanti di quelle a SP. In generale, entrambe le popolazioni di fibre peptidergiche contribuiscono all'innervazione cutanea costituendo piccoli fasci nel derma superficiale, paralleli alla membrana basale. Numerose fibre a CGRP risalgono nelle papille dermiche, così come alcune a SP, ma in nessuna occasione è stata riconosciuta una qualche associazione con i corpuscoli di Meissner. Le fibre intrapapillari sono osservabili in quantità variabile tutti i campioni, mentre terminali intraepiteliali, molto meno abbondanti, non sono stati rinvenuti in tutti i campioni, anche provenienti dalle medesime regioni cutanee. Le fibre peptidergiche intraepiteliali appaiono poco ramificate; alcune risalgono isolate gli strati più superficiali, con un andamento poco tortuoso.

E' stata inoltre riscontrata immunoreattività per il CGRP in alcune cellule di Merkel, identificate in parte per la loro forma ed in parte per la presenza, in sezioni adiacenti colorate per l'anti-PGP 9.5, di cellule di Merkel nella medesima localizzazione. In generale solo una parte delle cellule di Merkel appare contenere il neuropeptide. In altre occasioni si sono potute osservare cellule di Merkel isolate ma non innervate, sebbene in alcune occasioni siano state osservate fibre a CGRP nelle immediate vicinanze delle cellule

immunopositive per il medesimo neuropeptide (Fig. 5D). Nessuna cellula di Merkel è risultata invece immunopositiva per la SP. Infine, fibre nervose a CGRP si possono trovare in posizione perivascolare in tutti i campioni, così come intorno agli adenomeri delle ghiandole sudoripare. Fibre a SP sono state invece ritrovate solo ad innervare i vasi nel derma superficiale.

La proteina GAP-43 ha invece una distribuzione ubiquitaria nelle fibre nervose della cute sana, con una particolare abbondanza nella regione della giunzione dermo-epidermica (Verzè et al., 1988).

STRUTTURE NERVOSE NELLE CICATRICI DA USTIONE E NEI LEMBI.

Cicatrici da ustione

L'anticorpo anti-PGP 9.5 ha permesso di dimostrare un certo numero di fascetti nervosi nella lamina propria. Nel sottocutaneo si è potuto osservare in tutti i casi esaminati (15, compresi in un arco di tempo da un mese a 10 anni dall'ustione) un plesso nervoso dal quale si diramano sottili fibre che in parte penetrano nell'epidermide e in parte si arrestano nelle papille dermiche a formare strutture di complessità variabile, per la maggior parte terminazioni libere nel derma (nel 90% dei casi). Alcuni fibre nervose intensamente immunoreattive possono essere osservate in contatto con vasi sanguigni (nel 50% dei casi) e follicoli piliferi; gli adenomeri ghiandolari sono risultati innervati solo in due campioni. Per quanto riguarda i terminali sensitivi, sono stati identificati tre tipi diversi di strutture recettoriali: terminazioni libere intraepiteliali (nel 20% dei casi), complessi neurite-cellule di Merkel (un solo caso) e fibre libere dermiche (nel 90% dei campioni). Le fibre intraepiteliali sono presenti soltanto in piccolo numero, così come i complessi di Merkel. La loro struttura appare normale, con gruppi formati da cellule ovoidali o rotondeggianti nello strato basale dell'epidermide. Corpuscoli di Meissner o strutture simili non sono mai state evidenziate.

I risultati sulla presenza di neuropeptidi nelle cicatrici da ustione sono attualmente molto preliminari, ma dimostrano in generale una scarsa presenza di immunoreattività, soprattutto se confrontati con le analoghe sostanze osservate nei lembi.

Lembi cutanei

In generale, la distribuzione dell'immunoreattività per la PGP 9.5 è risultata simile a quella riscontrata nella cute sana, sebbene la quantità di strutture nervose presenti sia decisamente inferiore.

Nel derma superficiale, le fibre nervose orientate parallelamente alla superficie possono essere seguite generalmente solo per brevi tratti, esse sono state riscontrate in tutte le biopsie esaminate (14). Solo occasionalmente queste fibre sono riunite in fascetti, nella maggior parte dei casi sono isolate che si prolungano nelle papille. Nel 70% dei casi sono stati osservati terminali intraepiteliali con aspetto varicoso. In numerose occasioni sono stati infine osservati follicoli piliferi circondati da sparse fibre PGP 9.5-immunopositive, che dimostrano un orientamento circolare intorno al follicolo.

Per quanto riguarda i corpuscoli sensitivi, in quei lembi cutanei in cui sia la sede donatrice che quella ricevente coinvolgono falangi della mano o del piede è stata rilevata la presenza di corpuscoli di Meissner

innervati. Nel 40% dei casi è stata inoltre riscontrata una quantità variabile di cellule di Merkel. Queste cellule si trovano di solito isolate, sparse in diverse papille e non appaiono innervate. Infine, immunoreattività per la PGP 9.5 è stata osservata in associazione con fibre nervose perigliandolari e perivascolari in quasi tutti i campioni in cui queste strutture sono state osservate.

Per quanto riguarda i neuropeptidi, nei lembi cutanei abbiamo osservato una scarsa innervazione da parte di fibre a CGRP e a SP. In quasi tutti i campioni sono presenti solo sparse fibre nervose a CGRP con aspetto varicoso nel derma superficiale e all'interno delle papille dermiche, e l'osservazione di terminali intraepiteliali si è dimostrata del tutto occasionale. Le fibre a SP sono risultate invece del tutto assenti all'interno dell'epitelio e molto scarse sia nel derma superficiale che papillare. In trapianti di cute con peli, sottili fibre a CGRP circondano i follicoli piliferi, apparentemente organizzate a costituire fibre circolari. Occasionalmente, sparse fibre a SP sono state osservate all'interno dei follicoli. L'innervazione peptidergica a CGRP delle strutture vascolari e ghiandolari è risultata molto variabile, mentre né i vasi né le ghiandole hanno mostrato innervazione da parte di fibre a SP. Nessun corpuscolo di Meissner è risultato positivo, mentre in due occasioni sono state osservate cellule di Merkel contenenti CGRP.

CORRELAZIONI TRA SENSIBILITÀ E LIVELLI DI INNERVAZIONE.

Negli esperimenti sulle cicatrici e sugli innesti (Stella et al. 1994) sono state condotte analisi semi-quantitative considerando la presenza o assenza di: 1) fibre intraepiteliali [I], 2) recettori sensitivi complessi [C], 3) fibre nervose nelle papille dermiche [P], 4) fibre innervanti i vasi [V], 5) fibre innervanti le ghiandole sudoripare [G], 6) tronchi nervosi nel derma profondo [D]. Questi dati sono poi stati raggruppati per ogni caso in I) indice di innervazione superficiale [I+C+P], II) indice di innervazione profonda [V+G+D] e III) indice di innervazione totale [I+C+P+V+G+D].

Tutti i pazienti sono stati classificati dal punto di vista estesiologico in classe ad alta sensibilità (S3, S3+, S4) o a bassa sensibilità (S1, S1+, S2, S2+) (vedi Tab. 1). Queste classi sono state comparate statisticamente, per quanto riguarda la classe anatomica (cicatrici o innesti) e per la presenza di strutture immunoreattive, con l'analisi della varianza (ANOVA).

L'ANOVA ha rivelato una correlazione statisticamente significativa tra il punteggio sensitivo e l'indice di innervazione totale ($F=11,06$; $p=0,004$). Se poi si analizzano separatamente la distribuzione delle strutture superficiali e profonde, si continua ad apprezzare una correlazione significativa con l'indice di innervazione superficiale ($F=13,46$; $p=0,0019$), ma non con il profondo ($F=1,97$; $p=0,6408$). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata invece osservata tra cicatrici e innesti (indice di innervazione totale: $F=0,23$; $p=0,648$).

CONCLUSIONI

I risultati delle nostre indagini dimostrano chiaramente la superiorità delle tecniche d'indagine immunocitochimica sui metodi usati in precedenza. Le strutture nervose periferiche sono ben visibili con i markers strutturali (PGP 9.5, NSE oppure S-100) ed inoltre, l'utilizzo di marcatori *funzionali* (neuropeptidi, GAP-43) può fornire preziose indicazioni sul recupero funzionale nel corso della rigenerazione.

Inoltre l'entità della reinnervazione e la distribuzione delle strutture immunoreattive sono molto simili nella cute trapiantata e nelle cicatrici, mentre la distribuzione delle terminazioni capsulate sembra essere differente: solo nelle biopsie di lembi a distanza è stato infatti possibile evidenziare corpuscoli a gomito semplice o corpuscoli di Meissner.

Il recupero sensitivo osservato in seguito ad eventi traumatici o patologici è spesso incompleto od anomalo. Ciò è imputato alla mancata reinnervazione (e/o ad una reinnervazione non corretta) dei bersagli appropriati da parte delle fibre sensitive rigeneranti. Nel loro complesso i nostri dati contrastano con l'opinione diffusa di una mancata rigenerazione nelle cicatrici e nei trapianti cutanei e quella di un recupero sensitivo legato solo alle strutture nervose profonde non intaccate dalla lesione.

E' probabile che alcune fibre nervose rigenerate non riacquisiscano una normale funzionalità e ciò può essere in parte verificato mediante l'impiego di marcatori immunocitochimici come i neuropeptidi. Il riconoscimento delle fibre nervose per il loro contenuto in molecole funzionali fornisce infatti importanti indicazioni sia sulle possibilità rigenerative delle diverse popolazioni di fibre sensitive sia sulla loro ripresa funzionale. Nel modello sperimentale che stiamo attualmente sviluppando si è potuto dimostrare che le fibre peptidergiche analizzate (ritenute in gran parte nocicettori) sono in grado di reinnervare correttamente i territori cutanei denervati (Verzè et al., 1997b). La ricerca delle stesse fibre nervose nei lembi di cute allestiti nell'uomo ha fornito le medesime indicazioni. Questi dati possono pertanto costituire un'ottima base per una migliore interpretazione dei dati clinici ed elettrofisiologici rilevati nell'uomo, contribuendo ad ampliare gli strumenti disponibili per la verifica della validità delle terapie e delle tecniche chirurgiche.

Ringraziamenti. Questa ricerca è stata finanziata dalla FPSRU. L.Plumari è titolare di una borsa di studio della FPSRU.

BIBLIOGRAFIA

- Artz CP, Moncrief JA, Pruitt BA. Burns: a team approach. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1979.
- Björklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE. Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy skin. An immunohistochemical study. *Cell Tiss. Res.* 1986; 243: 51-57.
- Calcagni M, Stella M, Ramieri G, Cellino G, Panzica GC. Fibre nervose e recettori sensitivi nella cute umana evidenziati con anticorpo anti-protein gene product (PGP) 9.5. *Riv. It. Chirurgia Plastica* 1993; 25: 215-20.
- Dalsgaard CJ, Rydh M, Haegerstrand A. Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP9.5) antibodies. *Histochemistry* 1989; 92: 385-90
- Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 1996; 17: 390-96.
- Haro JJ, Vega JA, Del Valle ME, Calzada B, Zaccheo D, Malinovsky L. Immunohistochemical study of sensory nerve formations in human glabrous skin. *Eur.J.Morphol.* 1991; 29: 271-84.
- Iggo A, Andres KH. Morphology of cutaneous receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 1982; 5: 1-24.
- Karanth SS, Springall DR, Kuhn DM, Levene MM, Polak JM. An immunohistochemical study of cutaneous innervation and the distribution of neuropeptides and protein gene product 9.5 in man and commonly employed laboratory animals. *Am. J. Anatomy* 1991; 191: 369-83.
- Lawson SN, Harper AA, Harper EI. A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *J. Comp. Neurol.* 1984; 228: 263-72.
- MacKinnon SE, Dellon AL. Surgery of the peripheral nerve. Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1988.
- Panzica GC, Parainfo A, Garzino A, Ramieri G, Calcagni M, Stella M, Teich-Alasia S. Anatomical basis of nerve regeneration in human skin transplants. *Soc. Neurosci. Abstracts* 1995; 21: 1798.
- Panzica GC, Parainfo A, Ramieri G, Stella M, Calcagni M, Teich Alasia S. La rigenerazione sensitiva in trapianti cutanei dopo lesione da ustione. *Riv.Ital.Chirurgia Plastica*, 1997; 29: 103-123.
- Ramieri G, Anselmetti GC, Baracchi F, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Modica R. The innervation of human teeth and gingival epithelium as revealed by means of an antiserum for protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *Am. J. Anatomy* 1990a; 189: 146-54.
- Ramieri G, Aste N, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Stella M, Teich-Alasia S. Protein gene product 9.5: an improved immunohistochemical marker for peripheral nervous tissue. *Studies in normal and transplanted human skin. Neurosci. Lett.* 1990b; Suppl.39: 181.
- Ramieri G, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Modica R, Springall D, Polak JM. Non-innervated Merkel cells and Merkel-neurite complexes in human oral mucosa revealed using antiserum to protein gene product 9.5. *Archs oral Biol.* 1992a; 37, 263-69.
- Ramieri G, Stella M, Calcagni M, Teich-Alasia S, Cellino G, Panzica GC. The morphology of corpuscular receptors in hairy and non hairy human skin as visualized by an antiserum to protein gene product 9.5 compared to anti-neuron-specific enolase and anti-S-100 protein. *Acta Anatomica* 1992b; 144: 343-47.
- Stella M, Calcagni M, Teich-Alasia S, Ramieri G, Cellino G, Panzica GC. Sensory endings in skin grafts and scars after extensive burns. *Burns* 1994; 20: 491-95.

- Stella M, Ramieri G, Calcagni M, Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Teich-Alasia S. La rigenerazione nervosa sensitiva cutanea nel paziente ustionato. Revisione bibliografica. Riv. It. Chir. Plast. 1988; 20: 405-17.
- Stella M, Ramieri G, Anselmetti GC, Baracchi F, Calcagni M, Panzica GC, Teich-Alasia S. Rigenerazione nervosa nella cute cicatriziale e trapiantata dimostrata mediante un anticorpo contro la PGP 9.5. Riv. Ital. Chirurgia Plastica 1990; 22: 125-34.
- Verzè L, Paraninfo A, Stella M, Calcagni M, Teich-Alasia S, Panzica GC. Neuropeptides in human skin transplants. Ann.Endocrinol. 1997a; 58 (Suppl.1): 122.
- Verzè L, Paraninfo A, Ramieri G, Teich-Alasia S, Oestreicher AB, Viglietti-Panzica C, Panzica GC. Expression of B50/GAP-43 in the sensory peripheral nervous system of the adult rat. Soc. Neurosci.ABSTRACTS 1997b; 23: 1990.
- Verzè L, Plumari L, Sechi W, Stella M, Teich-Alasia S, Viglietti-Panzica C, Panzica GC. Distribution de l'immunoreactivite pour la GAP-43 dans la peau humaine normale de l'adulte. 80° Congrès Ass.Anatomistes 1998; in press.
- Wang L, Hilliges M, Jernberg T, Wiegleb-Edstrom D, Johansson O. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibers and cells in human skin. Cell Tiss. Res. 1990; 261: 25-33.