
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PAOLO BARBARESI, FIORENZO CONTI, TULLIO MANZONI

Ricerche morfologiche sulle collaterali assoniche delle proiezioni talamiche della formazione grigia periacqueduttale

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 73 (1982), n.5, p. 155–161.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1982_8_73_5_155_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia. — *Ricerche morfologiche sulle collaterali assoniche delle proiezioni talamiche della formazione grigia periacqueduttale* (*). Nota di PAOLO BARBARESI, FIORENZO CONTI e TULLIO MANZONI, presentata (**) dal Corrisp. O. PINOTTI.

SUMMARY. — Anatomical experiments were performed in 12 cats in order to ascertain whether the periaqueductal gray matter (PAG) projects to several thalamic nuclei by divergent axons collaterals originating from the same population of cells. By means of the double labeling technique based on the retrograde axonal transport of fluorescent tracers, PAG neurones were searched that contribute bifurcating axons to the following couples of thalamic nuclei: *i*) to the nuclei ventrales posteromediales (VPM) of the two sides; *ii*) to the nucleus parafascicularis (Pf) and ventralis posterolateralis (VPL) of the same side; *iii*) to the nucleus Pf and VPM of the same side. Fast Blue (FB), Evans Blue (EB) and Nuclear Yellow (NY) were used as fluorescent tracers. In other two groups, each consisting of 4 cats, FB injections into Pf were associated with either EB or NY injections within VPL or VPM. Double labeled neurones could be found within the PAG only in animals of the first group. It is concluded that PAG sends bifurcating axons originating from the same neurones to VPM of both sides and that the set of PAG neurones projecting to VPL or VPM are separate from the set projecting to Pf.

La formazione grigia periacqueduttale (GPA), che si estende nel tronco dell'encefalo dalla giunzione ponto-mesencefalica a quella mesencefalo-diencefalica, è stata oggetto nell'ultimo decennio di numerose ricerche neuroanatomiche, neurofisiologiche e neurochimiche [8, 16]. Questa struttura, infatti, sembra svolgere un ruolo di fondamentale importanza nel meccanismo endogeno antinocicettivo [8, 16]. Fu Reynolds che per primo dimostrò nel Ratto che la stimolazione elettrica della formazione GPA produce effetti analgesici così intensi da consentire interventi di laparotomia senza anestesia generale o locale [21]. Queste osservazioni furono successivamente confermate nel Gatto e nel Primate, Uomo incluso [16]. Circa i meccanismi neurofisiologici mediante i quali la formazione GPA esercita la sua azione antinocicettiva, una serie di ricerche eseguite in varie specie di mammiferi ha messo in evidenza che la stimolazione di questa struttura è in grado di inibire la ritrasmissione degli impulsi nocicettivi a livello del corno dorsale del midollo spinale e del nucleo caudale del trigemino [15, 27]. Si ritiene che questo effetto inibitorio esercitato sui *relais* nocicettivi segmentali sia per gran parte mediato da vie discendenti indirette, che si interrompono a livello di altre strutture reticolari del tronco encefalico [2]. È stato ipotizzato che la formazione GPA possa esercitare la sua azione antidolorifica anche a livello di quei nuclei talamici che ricevono proiezioni dalle vie ascendenti nocicettive

(*) Lavoro eseguito col sussidio del Ministero P. I. nell'Istituto di Fisiologia umana dell'Università di Ancona.

(**) Nella seduta del 25 novembre 1982.

[1-22]. Mediante tecniche anatomiche, infatti, è stato dimostrato nel Gatto che dalla formazione GPA originano proiezioni ascendenti destinate ai nuclei mediali e intralaminari ed al complesso ventrobassale (VB) del talamo [1, 5, 11, 20, 22]. È noto che nei primi termina gran parte del contingente mediale della via spino-talamica e trigemino-talamica e che nel complesso VB termina la componente laterale di queste vie ascendenti nocicettive. Nelle ricerche ora citate [1] è stato dimostrato mediante la tecnica del trasporto assonico retrogrado di perossidasi di rafano, che la proiezione destinata al complesso VB termina sia nella parte laterale (nucleo Ventralis Postero-Lateralis, n. VPL) che in quella mediale (nucleo Ventralis Postero-Medialis, n. VPM) del complesso. Le fibre destinate al n. VPL originano da neuroni che hanno sede nella parte laterale della formazione GPA ipsilaterale. Le fibre destinate al n. VPM originano anch'esse da neuroni localizzati nella parte laterale della formazione GPA ipsilaterale, ma il n. VPM riceve anche una proiezione originata dalle porzioni ventrali della formazione periacqueduttale di entrambi i lati. Pertanto, la proiezione GPA-VPL è solo ipsilaterale, quella GPA-VPM invece ha anche una componente contralaterale. È interessante notare che tra le proiezioni destinate ai nuclei mediali del talamo, quella che termina nel nucleo Parafascicolare (n. Pf) origina dalla regione dorsale e laterale della formazione GPA [6, 10]. Stando ai risultati di queste ricerche quindi, parte delle proiezioni destinate al n. Pf ed al complesso VB del talamo prendono origine da una medesima regione della formazione GPA.

La presente ricerca è stata eseguita con lo scopo di verificare l'ipotesi che parte delle proiezioni ascendenti della formazione GPA siano attuate da collaterali assoniche originate da una medesima popolazione neuronale. In particolare, si è voluto indagare la presenza di collaterali assoniche nelle proiezioni della formazione GPA destinate ai nn. VPM dei due lati nonché in quelle destinate al complesso VB ed al n. Pf.

Gli esperimenti sono stati eseguiti impiegando la tecnica anatomica della doppia marcatura di neuroni mediante trasporto assonico retrogrado di sostanze fluorescenti [14, 25]. Questa tecnica si basa sul principio che i neuroni possono trasportare, per via assonica retrograda, alcune sostanze fluorescenti dalla sede d'iniezione fino al soma cellulare e che talune di esse marcano in modo specifico, per sede o/e per colore, alcune componenti del soma stesso. Ad esempio, il Fast Blue (FB), il Nuclear Yellow (NY) e l'Evans Blue (EB) vengono tutti trasportati fino al soma cellulare ma il FB e l'EB si accumulano nel citoplasma mentre il NY si accumula nel nucleo [4, 14]. Inoltre, se i preparati istologici vengono esaminati mediante microscopio a fluorescenza, impiegando luce di 360 nm di lunghezza d'onda, il FB ed il NY emettono rispettivamente, fluorescenza azzurra e gialla, mentre l'EB emette fluorescenza rossa se viene impiegata luce di 550 nm di lunghezza d'onda. Pertanto, se due di queste sostanze vengono iniettate in due sedi diverse sarà possibile identificare in modo selettivo i neuroni che proiettano all'una o all'altra struttura iniettata (neuroni con singola marcatura) ovvero i neuroni che proiettano ad entrambe le strutture (neuroni con doppia marcatura).

Gli esperimenti sono stati eseguiti in 12 gatti suddivisi in tre gruppi sperimentali. Nel primo gruppo di animali (4 gatti), il n. VPM del talamo destro e sinistro sono stati iniettati, rispettivamente, con FB e con EB. Nel secondo gruppo (4 gatti), il n. Pf è stato iniettato con FB ed il n. VPL dello stesso lato con NY (3 gatti) o con EB (1 gatto). Nel terzo gruppo (4 gatti), il n. Pf è stato iniettato con FB ed il n. VPM dello stesso lato con NY (3 gatti) o con EB (1 gatto). Tutte le iniezioni sono state eseguite in anestesia con Ketamina (20 mg/Kg i.m.) per mezzo di microsiringhe montate su microguida sterotassica e guidate in profondità fino al nucleo talamico prescelto seguendo le coordinate sterotassiche del cervello di Gatto [12]. In ciascun nucleo è stata eseguita una singola iniezione di 0,5 μ l di sostanza marcante. Le sostanze venivano disciolte in H₂O distillata in modo da ottenere le seguenti concentrazioni: NY, 1%; FB, 4%; EB, 10%. A causa del diverso tempo occorrente per la marcatura dei neuroni con FB e NY ed al fine di prevenire la migrazione *in vivo* dei traccianti dai neuroni marcati per via retrograda [3], le due sostanze sono state iniettate nello stesso animale in due sedute sperimentali successive, in modo da ottenere tempi di sopravvivenza di 22 ore e di 5-7 giorni, rispettivamente, dopo le iniezioni di NY e di FB. Il FB e l'EB sono stati iniettati nello stesso animale nel corso di un'unica seduta, programmando un tempo di sopravvivenza di 5-7 giorni. Scaduto il tempo di sopravvivenza, gli animali venivano anestetizzati con Nembutal (30 mg/Kg i.p.) e sacrificati mediante perfusione intraaortica di soluzione fisiologica seguita da formalina al 10-15% e saccarosio al 10% in tampone di fosfato (pH 7,4). I cervelli venivano quindi prelevati e sezionati mediante microtomo congelatore (sezioni coronali di 40 μ m di spessore). Le sezioni venivano poste in acqua distillata, montate su vetrini ed asciugate all'aria. Il materiale istologico è stato esaminato mediante microscopio a fluorescenza Leitz Pleomopak, fornito di un sistema di filtri A e N₂ che forniscono, rispettivamente, luce di 360 nm e 550 nm di lunghezza d'onda. Una sezione ogni due è stata colorata con bleu di Toluidina al fine di identificare i confini dei nuclei talamici e mesencefalici. La distribuzione delle cellule marcate nella formazione GPA e l'estensione delle zone di iniezione sono state riprodotte mediante *computer microscope* [9].

I risultati possono essere riassunti come segue.

Nei nuclei VPL e VPM, sedi delle iniezioni, era presente un alone di intensa fluorescenza in stretta prossimità della traccia lasciata dall'ago. In alcuni animali dei tre gruppi sperimentali, un debole alone di fluorescenza è stato osservato anche nella porzione ventrale del confinante nucleo lateralis posterior. La possibilità che parte della sostanza iniettata possa aver contaminato questo nucleo non sembra possa avere ripercussioni sulla validità dei presenti risultati in quanto è stato dimostrato che la formazione GPA non viene proiettata al nucleo Lateralis Posterior [24]. Negli animali del secondo gruppo e del terzo gruppo, nei quali il n. Pf è stato iniettato con FB, è stata osservata una debole fluorescenza azzurra anche nel confinante nucleo Centro Mediano. Questo nucleo ha strette analogie funzionali con il n. Pf. Pertanto la possibilità che alcuni neuroni della formazione GPA possano aver assunto la sostanza marcante dal nucleo Centro Mediano sembra irrilevante sul piano funzionale ai fini della presente ricerca. Occorre

inoltre considerare che un recente studio anatomico [17] ha dimostrato che la formazione GPA ha esigue proiezioni destinate a questo nucleo.

Negli animali del *primo gruppo* sono stati osservati nella porzione laterale e ventrale della formazione GPA numerosi neuroni marcati con FB o con EB che erano stati iniettati, rispettivamente, nel n. VPM del talamo destro e sinistro. Ciascuna popolazione di neuroni marcati con un singolo tracciante era presente in entrambi i lati della struttura mesencefalica. Questa osservazione conferma i precedenti risultati già citati [1] secondo i quali la proiezione GPA-VPM è

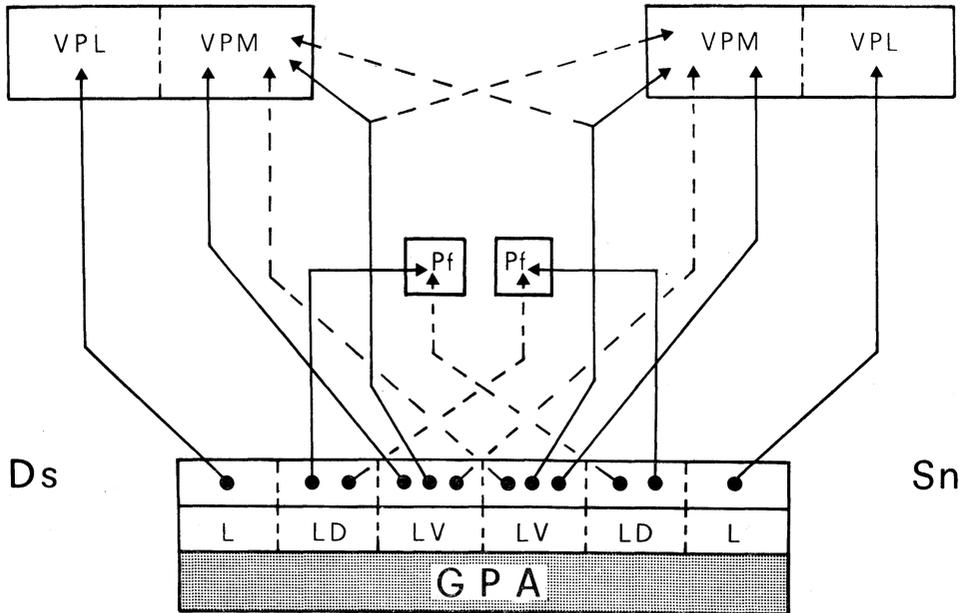


Fig. 1. - Schema delle connessioni tra la formazione grigia periacqueduttale ed i nuclei talamici VPL, VPM e Pf, quali risultano dalle ricerche esposte nel Testo. Le linee continue rappresentano le proiezioni ipsilaterali, quelle tratteggiate le proiezioni contralaterali. Abbreviazioni: GPA, formazione grigia periacqueduttale con le sue zone laterali, L, latero-dorsali, LD, e latero-ventrali, LV; VPL, VPM, Pf nuclei ventralis posterolateralis, ventralis postero-medialis, parafascicularis; Sn e Ds, lato destro e lato sinistro.

bilaterale. Il gruppo di neuroni che proietta al talamo ipsilaterale è numericamente più consistente di quello che proietta al talamo contralaterale. I due gruppi rappresentano, rispettivamente, il 50% ed il 35% circa dell'intera popolazione GPA-VPM. Il restante 15% è rappresentato da neuroni con doppia marcatura, vale a dire, da neuroni che hanno assunto, dai due nuclei VPM, entrambe le sostanze traccianti. La presenza di neuroni con doppia marcatura dimostra che parte delle proiezioni bilaterali GPA-VPM è attuata da collaterali assoniche originate da una stessa popolazione neuronica. Nella formazione GPA del primo gruppo sperimentale non sono state osservate cellule di glia contenenti sostanze fluorescenti, migrate in *in vivo* dai neuroni marcati per via retrograda, ovvero, da eventuali terminali assonici marcati per via anterograda. Tale mancanza consente

quindi di escludere che gran parte dei neuroni identificati come elementi di proiezione GPA-VPM fossero stati in realtà marcati per via indiretta, vale a dire, per via delle cellule di glia e non per via assonica retrograda.

Negli animali del *secondo e terzo gruppo* sperimentale il n. Pf era stato iniettato con FB ed il n. VPL (secondo gruppo) e VPM (terzo gruppo) con EB o NY. Nella formazione GPA degli animali di entrambi i gruppi sono stati identificati neuroni marcati solo dalla sostanza fluorescente iniettata nel n. Pf ovvero solo dalle sostanze iniettate nel n. VPL o VPM. Non sono stati invece riscontrati neuroni con doppia marcatura retrograda in nessuno dei preparati del secondo e terzo gruppo. Si deve pertanto ritenere che le proiezioni GPA-Pf originano da una popolazione di neuroni totalmente distinta dalla popolazione da cui prendono origine le proiezioni GPA-VB.

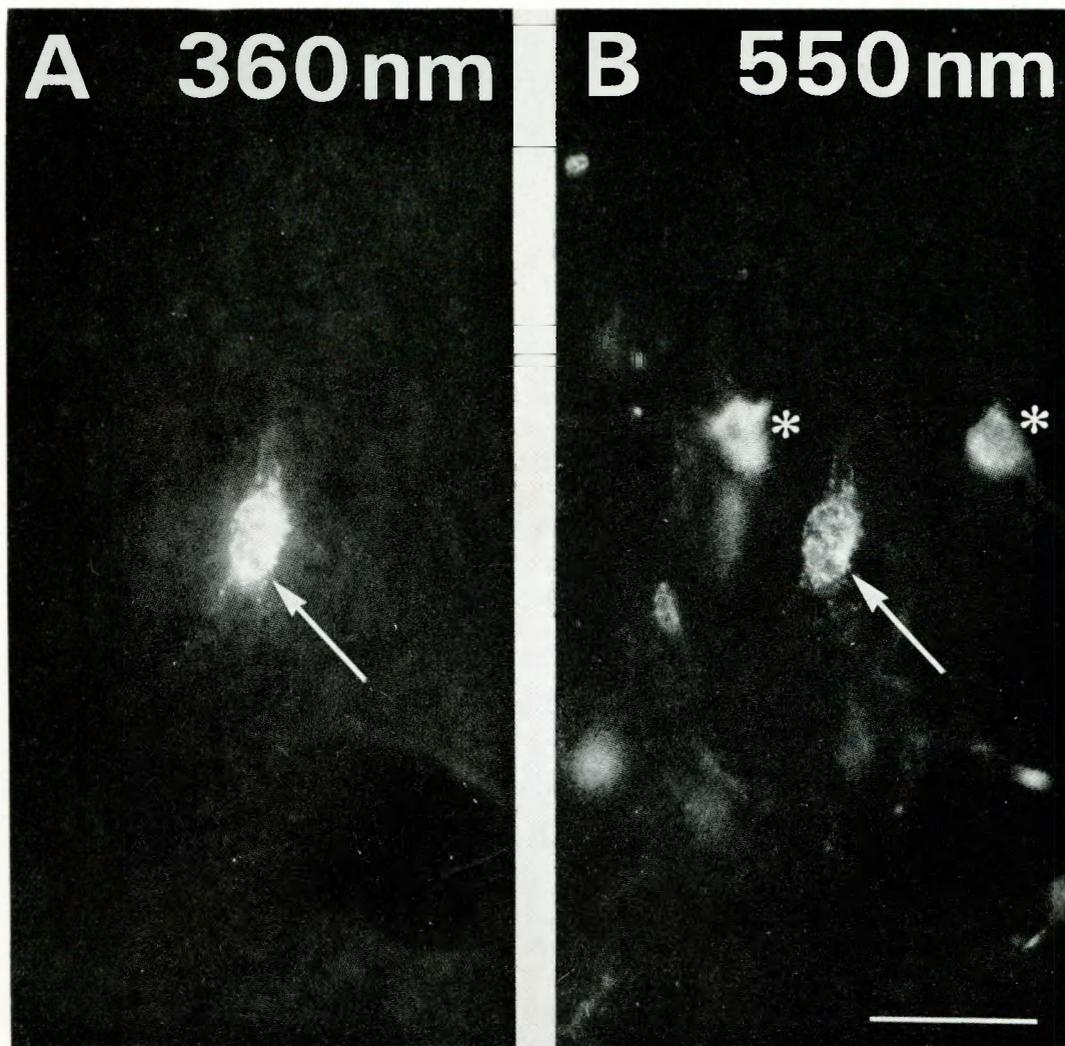
La distribuzione topografica dei due gruppi neuronici è simile a quella descritta nelle precedenti ricerche [1, 6]. Infatti, gran parte dei neuroni di proiezione GPA-VB era localizzata nella porzione laterale e ventrale della formazione grigia periacqueduttale mentre i neuroni di proiezione GPA-Pf ne occupavano la porzione laterale e dorsale. Pertanto, nella porzione laterale di questa formazione erano presenti entrambi i tipi di neuroni proiettivi ma, come specificato sopra, nessuno di essi ha mostrato segni di doppia marcatura. In alcuni animali del secondo e terzo gruppo sono stati osservati, nella formazione GPA alcuni nuclei di glia marcati con NY. I risultati ottenuti nella presente ricerca confermano in modo definitivo i risultati conseguiti nelle ricerche precedenti che avevano mostrato, mediante la tecnica del trasporto assonico retrogrado di perossidasi di rafano, che dalla formazione GPA prendono origine proiezioni ascendenti dirette ai nuclei talamici VPL e VPM e che quelle destinate a quest'ultimo nucleo sono bilaterali [1]. La tecnica della doppia marcatura di neuroni con sostanze fluorescenti ha inoltre consentito di fornire ulteriori dati circa l'organizzazione anatomica di queste proiezioni. Si è potuto mettere in evidenza infatti che una buona parte delle proiezioni bilaterali GPA-VPM sono di fatto attuate da collaterali di assoni emessi da una stessa popolazione di neuroni e che, invece, le proiezioni ascendenti destinate ai nuclei VPL e VPM prendono origine da un gruppo di neuroni completamente distinto da quello che proietta al n. Pf. Queste osservazioni si prestano per alcune brevi considerazioni circa l'ipotetico ruolo funzionale sotteso da queste proiezioni. Come è stato ricordato all'inizio, è stata prospettata l'ipotesi che le proiezioni originate dalla formazione GPA e destinate sia ai nuclei mediali ed intralaminari del talamo, tra cui il n. Pf, che al complesso VB, prendano parte al ben noto meccanismo antinocicettivo esercitato dalla formazione GPA, bloccando o modulando le risposte dei neuroni nocicettivi talamici [1, 22]. Tale ipotesi sembra essere avvalorata da precedenti osservazioni sperimentali le quali mostrano che le zone di origine delle proiezioni GPA-VB e GPA-Pf ricevono fibre, o collaterali di fibre, del tratto spino-talamico e trigemino-talamico [18, 26] e che i nuclei VPL, VPM e Pf contengono neuroni attivabili da stimoli nocivi [7, 13].

L'osservazione che le proiezioni inviate al complesso VB ed al nucleo parafascicolare originano da due popolazioni distinte di neuroni periacqueduttali può

ipoteticamente mettersi in relazione al distinto e specifico ruolo che queste due strutture talamiche svolgerebbero nella percezione del dolore [19]. A sua volta, la proiezione bilaterale destinata ai nuclei VPM dei due lati, ed attuata da collaterali assoniche dei medesimi neuroni della formazione GPA, potrebbe giustificarsi, sempre sul piano funzionale, considerando che la stimolazione unilaterale dei nocicettori trigeminali provoca risposte neuroniche nei nuclei VPM di entrambi i lati [23].

BIBLIOGRAFIA

- [1] BARBARESI P., CONTI F. e MANZONI T. (1982) - *Periaqueductal gray projection to the ventrobasal complex in the cat: an horseradish peroxidase study*. « Neurosci Lett. », 30, 205-209.
- [2] BASBAUM A. I., CLANTON C. H. e FIELDS H. L. (1978) - *Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: An autoradiographic study of pain modulating systems*. « J. Comp. Neurol. », 179, 209-224.
- [3] BENTIVOGLIO M., KUYPERS H. G. J. M. e CASTMAN-BERREVOETS C. E. (1980) - *Retrograde neuronal labelling by means of bisbenzimidazole and Nuclear Yellow (Hoechst 769-121). Measures to prevent diffusion of the tracers out of retrogradely labelled neurons*. « Neurosci. Lett. », 18, 19-24.
- [4] BENTIVOGLIO M., KUYPERS H. G. J. M., CASTMAN-BERREVOETS C. E., MOEWE H. e DANN O. (1980) - *Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances*. « Neurosci. Lett. », 18, 25-30.
- [5] CHI C. C. (1970) - *An experimental silver study of the ascending projections of the central gray substance and adjacent tegmentum in the rat with observations in the cat*. « J. Comp. Neurol. », 139, 259-272.
- [6] COMANS P. E. e SNOW P. J. (1981) - *Ascending projections to nucleus parafascicularis of the cat*. « Brain Res. », 230, 337-341.
- [7] DONG W. K., RYU H. e WAGMAN I. H. (1978) - *Nociceptive responses in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways*. « J. Neurophysiol. », 41, 1592-1613.
- [8] FIELDS H. L. e BASBAUM A. I. (1978) - *Brainstem control of spinal pain-transmission neurons*. « Ann. Rev. Physiol. », 40, 259-272.
- [9] GLASER E. M. e VAN DER LOOS H. (1965) - *A semi-automatic computer microscope for the analysis of neuronal morphology*. « IEEE Trans. Bio-Med. Engineer. », 12, 22-31.
- [10] HAMILTON B. L. (1973) - *Projections of the nuclei of the periaqueductal gray matter in the cat*. « J. Comp. Neurol. », 152, 45-58.
- [11] HAMILTON B. L. e SKULTETY F. M. (1970) - *Efferent connections of the periaqueductal gray matter in the cat*. « J. Comp. Neurol. », 139, 105-114.
- [12] JASPER H. H. e AJMONE-MARSAN C. (1954) - *A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat*, The National Research Council of Canada, Ottawa.
- [13] KENSHALO D. R. Jr., GIESLER G. J. Jr., LEONARD R. B. e WILLIS W. D. (1980) - *Responses of neurons in primate ventral posterior lateral nucleus to noxious stimuli*. « J. Neurophysiol. », 43, 1594-1614.
- [14] KUYPERS H. G. J. M., CASTMAN-BERREVOETS C. E. e PADT R. E. (1977) - *Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain*. « Neurosci. Lett. », 6, 127-135.
- [15] LIEBESKIND J. C., GUILBAUD G., BESSON J. M. e OLIVERAS J. (1973) - *Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons*. « Brain Res. », 50, 441-446.



- [16] MAYER D. J. (1979) – *Endogenous analgesia systems: neural and behavioural mechanisms*. In J. J. Bonica, J. C. Liebeskind, D. Albe-Fessard (Eds.), *Advances in Pain Research and Therapy*, vol. 3, Raven Press, New York, pp. 385–410.
- [17] MCGUINNESS C. M. e KRAUTHAMER G. M. (1980) – *The afferent projections to the Centrum Medianum of the cat as demonstrated by retrograde transport of horseradish peroxidase*, « *Brain Res.* », 184, 255–269.
- [18] MEHLER W. R. (1969) – *Some neurological species differences. A posteriori*. « *Ann. N. Y. Acad. Sci.* », 167, 424–468.
- [19] MELZACK R. e CASEY K. L. (1968) – *Sensory, motivational and central control determinants of pain: A new conceptual model*. In « *The Skin Sense* », D. R. Keshalo (ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Ill., pp. 423–439.
- [20] NAUTA W. J. H. (1958) – *Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat*. « *Brain* », 81, 319–340.
- [21] REYNOLDS D. V. (1969) – *Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation*. « *Science* », 164, 444–445.
- [22] RUDA M. A. (1975) – *An autoradiographic study of the efferent connections of the midbrain central gray in the cat*. « *Anat. Rec.* », 181, 468–469.
- [23] SHIGENAGA Y., MATANO S., OKADA K. e SAKAI A. (1973) – *The effects of tooth pulp stimulation in thalamus and hypothalamus of the rat*. « *Brain Res.* », 63, 402–407.
- [24] SPREAFICO R., KIRK C., FRANCESCHETTI S. e AVANZINI G. (1980) – *Brain stem projections to the pulvinar-lateralis posterior complex of the cat*. « *Exp. Brain Res.* », 40, 209–220.
- [25] STEWARD O. (1981) – *Horseradish peroxidase and fluorescent substances and their combination with other techniques*. In L. Heimer e M. J. RoBars (Eds.) « *Neuroanatomical Tract-Tracing Methods* », Plenum Press, New York, pp. 279–310.
- [26] TIWARI R. K. e KING R. B. (1974) – *Fiber projections from the trigeminal nucleus caudalis in Primate (Squirrel monkey and Baboon)*. « *J. Comp. Neurol.* », 158, 191–206.
- [27] YOKOTA T. e HASHIMOTO S. (1976) – *Periaqueductal gray and tooth pulp afferent interaction on units in caudal medulla oblongata*. « *Brain Res.* », 117, 508–512.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Neuroni della formazione grigia periacqueduttale marcati per via assonica retrograda a seguito di iniezioni di Fast Blue e di Evans Blue eseguite, rispettivamente, nel nucleo ventralis posteromedialis del talamo destro e sinistro.

In A e B è mostrato un neurone (indicato con freccia) che ha assunto entrambe le sostanze fluorescenti (neurone con doppia marcatura). In B sono mostrati altri due neuroni, indicati con asterisco, che hanno assunto solo Evans Blue (neuroni con singola marcatura). Microfotografie dello stesso campo eseguite illuminando il preparato con luce di 360 nm (A) e 550 nm (B) di lunghezza d'onda.

Calibrazione: 50 μm per A e B.