
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIA ELENA GRAZIOSI, ELISABETTA TUCCI, PAOLO
BARBARESI, GABRIELLA UGOLINI, TULLIO MANZONI

**Neuroni cortico-corticali dell'area somestesica SI del
Gatto: studio anatomico delle collaterali assoniche
mediante l'impiego di traccianti fluorescenti**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 73 (1982), n.5, p. 175–180.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1982_8_73_5_175_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. — *Neuroni cortico-corticali dell'area somestesica SI del Gatto: studio anatomico delle collaterali assoniche mediante l'impiego di traccianti fluorescenti* (*). Nota di MARIA ELENA GRAZIOSI, ELISABETTA TUCCI, PAOLO BARBARESI, GABRIELLA UGOLINI e TULLIO MANZONI, presentata (**) dal Corresp. O. PINOTTI.

SUMMARY. — The present experiments were performed in the cat in order to determine the existence of axonal branching of cortico-cortical neurones of area SI. The retrograde fluorescent double labelling technique was adopted. In a first group of animals, associative SI-SII and callosal SI-SII projecting neurones were retrogradely labelled by injecting, respectively, Fast Blue in the ipsilateral SII and Nuclear Yellow in the contralateral SII. In a second group of animals, the callosal SI-SI and SI-SII projecting neurones were retrogradely labelled by injecting, respectively, Nuclear Yellow in SI and Fast Blue in SII of the contralateral hemisphere. In each group of animals, double labelled cells were rarely found in SI. It is concluded that the different sets of cortico-cortical projections of SI arise overwhelmingly from separate populations of neurones.

È noto che dall'area somestesica prima (SI) originano proiezioni cortico-corticali destinate all'area somestesica seconda (SII) dello stesso emisfero (proiezioni associative) ed alle aree SI e SII dell'emisfero contralaterale (proiezioni callosali) [3, 6, 7, 9, 10]. Recenti ricerche morfologiche, basate sul trasporto assonico retrogrado di perossidasi di rafano, hanno dimostrato che nell'area SI del Gatto sia le proiezioni associative che callosali originano in prevalenza da neuroni piramidali del III strato corticale e da neuroni piramidali e fusiformi del VI strato [3, 9, 10]. Mettendo in relazione la distribuzione topografica di questi neuroni con la mappa fisiologica della rappresentazione del corpo, definita mediante l'analisi microelettrodica delle risposte neuroniche agli stimoli periferici, è stato inoltre accertato che le diverse proiezioni cortico-corticali prendono origine da specifiche zone dell'area SI. Infatti, le proiezioni associative SI-SII nascono prevalentemente dalla zona di rappresentazione della parte distale dell'arto anteriore, quelle callosali SI-SII dalle zone di rappresentazione della parte distale dell'arto anteriore e posteriore e del tronco, mentre le proiezioni callosali SI-SI originano esclusivamente dalla zona di rappresentazione del tronco. Secondo queste ricerche, quindi, in alcune zone dell'area SI sono presenti popolazioni di neuroni che proiettano ad aree corticali diverse. Ad esempio, dalla zona di rappresentazione della porzione distale dell'arto anteriore originano sia fibre associative che callosali destinate, rispettivamente, all'area SII ipsila-

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

(**) Nella seduta del 25 novembre 1982.

terale e contralaterale, mentre dalla regione del tronco origina un sistema di fibre callosali che termina sia nell'area SI che SII dell'emisfero contralaterale. Come riferito sopra, queste proiezioni cortico-corticali prendono origine da neuroni che hanno sede nelle stesse lamine corticali. È pertanto ipotizzabile che differenti proiezioni, che abbiano in comune la zona di origine, possano essere costituite, almeno in parte, da collaterali assoniche di una medesima popolazione neuronica. In altri termini, l'ipotesi prospettata prevede che un neurone di proiezione cortico-corticale possa avere l'assone suddiviso in due o più collaterali, ciascuna delle quali potrebbe terminare in aree corticali diverse.

A fine di sottoporre a verifica sperimentale l'ipotesi ora prospettata, sono stati eseguiti i presenti esperimenti impiegando la tecnica della doppia marcatura di neuroni mediante trasporto assonico retrogrado di sostanze fluorescenti. Tale tecnica prevede che se due strutture nervose sono iniettate ciascuna con una diversa sostanza fluorescente, quale ad esempio il Fast Blue (FB) ed il Nuclear Yellow (NY) utilizzate nella presente ricerca, è possibile identificare, mediante marcatura selettiva, quei neuroni che proiettano all'una o all'altra struttura iniettata (neuroni con marcatura singola) ovvero ad entrambe le strutture (neuroni con marcatura doppia) [2]. Queste due sostanze traccianti, infatti, vengono egualmente assunte dai terminali assonici, presenti nelle sedi di iniezione, e trasportate per via assonica retrograda fino al soma cellulare, ma ciascuna delle due conferisce ai neuroni una marcatura specifica per sede e per colore. Il FB si distribuisce nel citoplasma, mentre il NY si accumula solo nel nucleo. Inoltre, se i preparati istologici vengono osservati al microscopio a fluorescenza ed illuminati con luce di 360 nm di lunghezza d'onda, il primo tracciante emette fluorescenza azzurra, il secondo giallo oro. Pertanto, nei neuroni marcati con FB il soma cellulare, ed eventualmente i dendriti, appariranno colorati in azzurro, mentre in quelli marcati con NY apparirà colorato in giallo oro solo il nucleo. I neuroni che abbiano assunto entrambe le sostanze dalle due diverse sedi di iniezione avranno invece una duplice emissione fluorescente, sia del citoplasma che del nucleo [8]. La collateralizzazione assonica è stata indagata in due diverse coppie di proiezioni cortico-corticali dell'area SI. La prima coppia è costituita dalle proiezioni associative e callosali originate dalla zona di rappresentazione della parte distale dell'arto anteriore e destinate, rispettivamente, all'area SII dell'emisfero ipsilaterale ed all'area SII dell'emisfero contralaterale. La seconda coppia è costituita dalle proiezioni callosali originate dalla zona di rappresentazione del tronco e destinate alle zone omologhe sia dell'area SI che SII dell'emisfero contralaterale.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in 16 gatti adulti, suddivisi in due gruppi sperimentali ciascuno composto da 8 animali. Gli animali del primo e del secondo gruppo sperimentale sono stati utilizzati, rispettivamente, per lo studio della prima e della seconda coppia di proiezioni cortico-corticali dell'area SI cui è stato fatto riferimento in precedenza (fig. 1). Pertanto, negli animali del primo gruppo è stato iniettato il NY (7-10 iniezioni di 0,3 μ l ciascuna; 1% in acqua distillata) nell'area SII dell'emisfero sinistro (zona di rappresentazione dell'arto anteriore) ed il FB (7-9 iniezioni di 0,5 μ l ciascuna; 4% in acqua distillata) nell'area SII dell'emisfero destro (zona di rappresentazione dell'arto

anteriore). Negli animali del secondo gruppo, il NY ed il FB (stesse quantità e concentrazioni del primo gruppo sperimentale) sono stati iniettati, rispettivamente, nell'area SI ed SII dell'emisfero destro (zone di rappresentazione del tronco). Tutte le iniezioni sono state eseguite mediante microsiringhe, in condizioni di asepsi ed in corso di anestesia con Ketamina (20 mg/Kg i.m.). A causa del diverso tempo occorrente per la marcatura di neuroni con NY e FB, più breve per il primo, e della diversa distanza tra le due sedi delle iniezioni e l'area SI da esaminare, i due traccianti sono stati iniettati in due sedute successive, in modo tale da ottenere tempi di sopravvivenza di 20-22 ore e 144-149 ore,

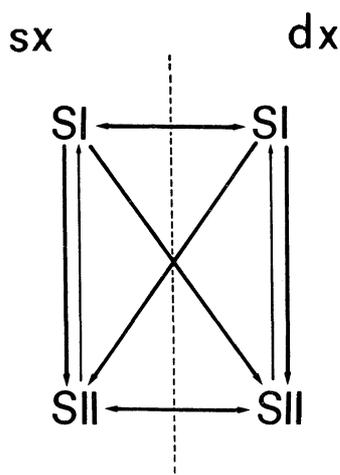


Fig. 1. - Rappresentazione schematica delle proiezioni associative e callosali dell'area somestesica prima (SI) e seconda (SII) della corteccia cerebrale. La linea tratteggiata indica la linea mediana interemisferica. dx e sx: lato destro e lato sinistro.

rispettivamente, dalle iniezioni di NY e FB. Come è noto, tempi di sopravvivenza più lunghi comportano la migrazione *in vivo* di ciascun tracciante dai neuroni marcati per via retrograda con conseguente accumulo della sostanza nelle cellule di glia e nei neuroni circostanti che risultano marcati per via indiretta [1]. Trascorso il tempo di sopravvivenza stabilito, gli animali venivano anestetizzati con Nembutal (30 mg/Kg i.p.) e sacrificati mediante perfusione intracardiaca con soluzione fisiologica seguita da una soluzione di formalina al 15% in tampone difosfato (pH 7,4). I cervelli venivano rimossi, posti su un microtomo congelatore e sezionati in piani frontali (sezioni di 40 μ m). Una sezione ogni due veniva immersa in acqua distillata ed immediatamente montata su vetrino per evitare fenomeni di migrazione *in vitro*, facilitati dall'immersione in acqua [1]. Il materiale veniva essiccato all'aria e successivamente esaminato con un microscopio a fluorescenza Leitz Pleomopack, equipaggiato con un sistema di filtro-specchio A, che fornisce una luce della lunghezza d'onda di 360 nm. La distribuzione dei neuroni marcati nell'area SI è stata riprodotta graficamente mediante un computer-microscope [5]. Alcune sezioni sono state controcolorate con blu di toluidina.

I risultati ottenuti nei due gruppi di animali possono essere riassunti come segue.

1. DISTRIBUZIONE DEI NEURONI DI ORIGINE DELLE PROIEZIONI ASSOCIATIVE SI-SII E CALLOSALI SI-SII

Negli animali del primo gruppo sono stati presi in considerazione solo i risultati ottenuti dallo studio istologico dell'area SI dell'emisfero destro, nella quale non sono stati messi in evidenza segni di diffusione extraneuronica dei due traccianti. I risultati ottenuti nell'area SI dell'emisfero sinistro non sono stati invece valutati in quanto in quest'area sono stati osservati numerosi nuclei di glia marcati con NY [1]. Tali nuclei costituiscono il segno evidente della diffusione in *vivo* di questo tracciante dai neuroni marcati per via retrograda, verosimilmente perchè il periodo di sopravvivenza degli animali, dopo le iniezioni nell'area SII di sinistra, è risultato eccessivamente lungo in rapporto alla distanza fra quest'area e l'area SI ipsilaterale. Nell'area SI dell'emisfero destro erano presenti numerosi neuroni marcati con FB o con NY (Tav. I A e I B). Come già specificato più sopra, queste due sostanze erano state iniettate, rispettivamente, nell'area SII ipsilaterale ed in quella contralaterale. Pertanto, i neuroni marcati con il primo tracciante sono stati identificati come neuroni efferenti associativi SI-SII, quelli marcati con NY come neuroni efferenti callosali SI-SII. La distribuzione delle due popolazioni di neuroni cortico-corticali nell'area SI è risultata in accordo con quanto descritto nelle precedenti ricerche eseguite mediante la tecnica del trasporto assonico retrogrado di perossidasi di rafano [3, 9]. Il giro coronale, corrispondente alla zona di rappresentazione della parte distale dell'arto anteriore, conteneva entrambi i tipi di neuroni cortico-corticali. La grande maggioranza dei neuroni associativi era localizzata nelle lamine III e VI, ma alcuni di essi erano presenti anche nelle lamine II, IV e V. I neuroni callosali, meno numerosi dei primi, erano anch'essi distribuiti, prevalentemente, nelle lamine III e VI. In questi animali non si è potuta rilevare nessuna apparente segregazione topografica delle due popolazioni di neuroni marcati con FB o NY. Neuroni dei due tipi avevano spesso rapporti di contiguità così stretti da far ritenere che entrambi potessero appartenere alla medesima colonna corticale. Neuroni marcati sia con FB che con NY (doppia marcatura) sono risultati estremamente rari. In genere, per ogni sezione istologica, sono stati rintracciati non più di uno o due neuroni con doppia marcatura. Tali cellule rappresentano meno dell'1% dell'intera popolazione neuronica marcata con FB o con NY.

2. DISTRIBUZIONE DEI NEURONI DI ORIGINE DELLE PROIEZIONI CALLOSALI SI-SI ED SI-SII

Nel secondo gruppo di animali, la distribuzione dei neuroni marcati per via retrograda è stata studiata nell'area SI dell'emisfero sinistro, nella quale non sono state messe in evidenza cellule di glia marcate con i due traccianti fluorescenti. In quest'area erano presenti numerosi neuroni marcati per via retrograda con FB o con NY. Questi due traccianti erano stati iniettati, rispettivamente, nel-

l'area SII ed SI dell'emisfero contralaterale. I neuroni marcati con il primo tracciante sono stati quindi identificati come neuroni callosali SI-SII, quelli marcati con il secondo tracciante come neuroni callosali SI-SI. In accordo con quanto descritto nei precedenti lavori [3, 10], queste due popolazioni di neuroni callosali erano distribuite prevalentemente nelle lamine III e VI della parte centrale del giro sigmoideo posteriore, corrispondente alla zona di rappresentazione del tronco dell'area SI. I due tipi di neuroni callosali erano fra loro frammisti, spesso molto vicini gli uni agli altri, tanto da far ritenere, anche in questo caso, che talune cellule di proiezione callosale SI-SII e SI-SI potessero appartenere alle stesse colonne corticali. Come già descritto per gli animali del primo gruppo, anche in questi preparati i neuroni con doppia marcatura sono risultati estremamente rari. Negli animali del secondo gruppo, un discreto numero di neuroni con marcatura doppia è stato rintracciato nel complesso ventrobasale del talamo, ipsilaterale alle sedi di iniezione [12].

I risultati ottenuti nelle presenti ricerche confermano i dati dei precedenti esperimenti basati sul trasporto assonico retrogrado di perossidasi di rafano [3, 9, 10] dimostrando che nelle lamine III e VI della zona di rappresentazione della parte distale dell'arto anteriore dell'area SI sono contenuti neuroni efferenti associativi SI-SII e callosali SI-SII e che nelle stesse lamine della zona di rappresentazione del tronco sono presenti neuroni di origine delle proiezioni callosali SI-SII e SI-SI. I risultati dimostrano inoltre che ciascuna proiezione cortico-corticale, facente parte delle due coppie di proiezioni indagate, prende origine da popolazioni distinte di neuroni corticali dell'area SI. Neuroni cortico-corticali con assoni provvisti di collaterale associativa e callosale ovvero di collaterali callosali destinate ad aree diverse sono infatti estremamente rari. È interessante ricordare che i neuroni cortico-corticali, sia associativi che callosali, ricevono dai neuroni talamo-corticali di *relais* informazioni sensoriali che vengono poi trasferite per via transcorticale alle aree di proiezione. È verosimile che quei neuroni cortico-corticali, che hanno sede nella stessa lamina della medesima colonna corticale, ricevano identiche informazioni sensoriali. Rimane a questo punto da giustificare, sul piano funzionale, perchè queste informazioni vengano inviate alle altre aree corticali da popolazioni neuronali distinte piuttosto che da collaterali assoniche originate da una medesima popolazione. Pur non potendosi escludere che altre proiezioni efferenti dell'area SI siano costituite da una popolazione numericamente più consistente di neuroni provvisti di assoni collateralizzati, è interessante rilevare che risultati simili a quelli descritti nelle presenti ricerche sono stati ottenuti indagando altri sistemi efferenti corticali. È stato dimostrato infatti, mediante tecniche morfologiche di doppia marcatura di neuroni che le cellule cortico-spinali del Ratto non inviano collaterali assoniche al corpo calloso [4] e che solo una percentuale non significativa (dell'ordine dell'1%) dei neuroni cortico-corticali della corteccia prefrontale della Scimmia è provvista di assoni con collaterali callosali ed associative [11]. Anche i neuroni efferenti dell'area uditiva primaria del Gatto sono raramente provvisti di collaterali assoniche [13]. Sembrerebbe quindi che nel piano organizzativo della corteccia cerebrale non siano previste efferenze multiple attuate da collaterali assoniche. È

stato invece dimostrato che numerosi sistemi sottocorticali provvisti di proiezioni destinate a strutture nervose diverse si avvalgono comunemente di collaterali assoniche [cfr. dati e letteratura in 8].

BIBLIOGRAFIA

- [1] BENTIVOGLIO M., KUYPERS H. G. J. M. e CATSMAN-BERREVOETS C. E. (1980) - *Retrograde neuronal labeling by means of bisbenzimidazole and Nuclear Yellow (Hoechst 769121). Measures to prevent diffusion of the tracers out of retrogradely labelled neurons.* «Neurosci. Lett.», 18, 19-24.
- [2] BENTIVOGLIO M., KUYPERS H. G. J. M., CATSMAN-BERREVOETS C. E., LOEWE H. e DANN O. (1980) - *Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances.* «Neurosci. Lett.», 18, 25-30.
- [3] CAMINITI R., INNOCENTI G. M. e MANZONI T. (1979) - *The anatomical substrate of callosal messages from SI and SII in the cat.* «Exp. Brain Res.», 35, 295-314.
- [4] CATSMAN-BERREVOETS C. E., LEMON R. N., VERBURGH C. A., BENTIVOGLIO M. e KUYPERS H. G. J. M. (1980) - *Absence of callosal collaterals derived from rat corticospinal neurons. A study using fluorescent retrograde tracing and electrophysiological techniques.* «Exp. Brain Res.», 39, 433-440.
- [5] 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.
- [6] JONES E. G. e POWELL T. P. S. (1968) - *The ipsilateral connections of the somatic sensory areas in the cat.* «Brain Res.», 9, 71-94.
- [7] JONES E. G. e POWELL T. P. S. (1968) - *The commissural connections of the somatic sensory cortex in the cat.* «J. Anat. (Lond.)», 103, 433-455.
- [8] KUYPERS H. G. J. M., BENTIVOGLIO M., CATSMAN-BERREVOETS C. E. e BHAROS A. T. (1980) - *Double retrograde neuronal labelling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelength which label different features of the cells.* «Exp. Brain Res.», 40, 383-392.
- [9] MANZONI T., CAMINITI R., SPIDALIERI G. e MORELLI E. (1979) - *Anatomical and functional aspects of the associative projections from somatic area SI to SII.* «Exp. Brain Res.», 34, 453-470.
- [10] MANZONI T., BARBARES P., BELLARDINELLI E. e CAMINITI R. (1980) - *Callosal projections from the two body midlines.* «Exp. Brain Res.», 39, 1-9.
- [11] SCHWARTZ M. L. e GOLDMAN-RAKIC P. S. (1981) - *Callosal and associational axon collaterals of prefrontal cortical neurons in the Rhesus Monkey demonstrated by retrograde fluorescent tracers.* «Abs., Soc. for Neurosci., 11th ann. meet., Los Angeles, Calif., oct.», 417, 18-23.
- [12] SPREAFICO R., HAYES N. L. e RUSTIONI A. (1981) - *Thalamic projections to the primary and secondary somatosensory cortices in cat: single and double retrograde tracer studies.* «J. Comp. Neurol.», 203, 67-90.
- [13] WONG D. e KELLY P. J. (1981) - *Differentially projecting cells in individual layers of the auditory cortex: a double-labeling study.* «Brain Res.», 230, 362-366.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Microfotografie di due neuroni cortico-corticali del III strato dell'area somestesica prima del Gatto. A, neurone callosale SI-SII il cui nucleo è stato marcato per via assonica retrograda con Nuclear Yellow, iniettato nell'area somestesica seconda dell'emisfero contralaterale. B, neurone associativo SI-SII il cui citoplasma è stato marcato per via assonica retrograda con Fast Blue, iniettato nell'area somestesica seconda dell'emisfero ipsilaterale. Illuminazione con luce di 360 nm di lunghezza d'onda.

Calibrazione: 50 μ m per A e B.

