
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PAOLO BARBARESI, MARA FABRI, FIORENZO CONTI,
TULLIO MANZONI

Marcatura retrograda selettiva con D- $[^3H]$ Aspartato dei neuroni delle proiezioni cortico-corticali destinate all'area SI

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 81 (1987), n.4, p. 433–438.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1987_8_81_4_433_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. — *Marcatura retrograda selettiva con D-[³H] Aspartato dei neuroni delle proiezioni cortico-corticali destinate all'area SI (*)*.

Nota di PAOLO BARBARESI, MARA FABRI, FIORENZO CONTI e TULLIO MANZONI, presentata (**) dal Corrisp. O. PINOTTI.

ABSTRACT. — D-[³H] Aspartate retrograde labelling of cortico-cortical neurones of somatosensory areas. A solution of D-[³H]Aspartate mixed with horseradish peroxidase (HRP) was injected in the trunk and forelimb representation zones of area SI. Neurones labelled with D-[³H]Aspartate were absent from the thalamus ipsilateral to the injected areas, but numerous neurones retrogradely labelled with this radioactive marker were present in the ipsilateral area SII (SII-SI associative neurones) and in the contralateral area SI (SI-SI callosal neurones). In both areas, cells labelled with silver grains were topographically distributed in the same regions containing cells retrogradely labelled with HRP. Associative and callosal neurones retrogradely labelled with D-[³H]Aspartate showed a laminar pattern similar to that of associative and callosal neurones labelled with HRP, with one exception. In the inner half of layer III, associative and callosal neurones labelled with D-[³H]Aspartate were much less numerous than those labelled with HRP.

The present results indicate that D-[³H]Aspartate is a selective tracer for a high proportion of associative and callosal neurones of areas SI and SII. These labelled neurones therefore are likely to use Aspartate and/or Glutamate as neurotransmitter. The reasons by which cortico-cortical neurons of lower layer III were unlabelled remain unsolved. These neurones might utilize different chemical(s) as neurotransmitter(s) or, alternatively, they might represent a case of phalse negativity.

KEY WORDS: Tritiated D-Aspartate; Cortico-cortical connections; Somatosensory areas; Excitatory amino acids; Cat.

RIASSUNTO. — Una miscela di D-[³H]Aspartato e perossidasi di rafano (HRP) veniva iniettata nelle zone di rappresentazione del tronco e dell'arto anteriore distale dell'area SI. Nel talamo ipsilaterale alla sede di iniezione non erano presenti neuroni marcati per via retrograda con il D-[³H]Aspartato. Numerosi neuroni marcati con la sostanza radioattiva erano invece presenti nell'area SII ipsilaterale (neuroni associativi SII-SI) e nell'area SI contralaterale (neuroni callosali SI-SI). In entrambe le aree, i neuroni marcati con D-[³H]Aspartato erano distribuiti nelle stesse regioni in cui erano anche presenti neuroni marcati per via retrograda con HRP. I neuroni associativi e callosali che avevano accumulato D-[³H]Aspartato avevano una distribuzione laminare simile a quella dei neuroni associativi e callosali HRP-positivi. Tuttavia, nella

(*) Lavoro eseguito con il sussidio del Ministero della P.I. e della Regione Marche nell'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Ancona.

(**) Nella seduta del 19 giugno 1987.

porzione più profonda del III strato, i neuroni associativi e callosali marcati con l'Aspartato triziato erano molto meno numerosi di quelli marcati con HRP.

I presenti risultati indicano che il D- ^3H Aspartato è un tracciante selettivo per una notevole proporzione dei neuroni associativi e callosali delle aree SI ed SII. Questi neuroni, pertanto, utilizzano verosimilmente Aspartato e/o Glutamato come neurotrasmettitore. Non sono note le ragioni per le quali i neuroni cortico-corticali della porzione più profonda del III strato si marchino più raramente con il tracciante radioattivo. Questi neuroni potrebbero utilizzare una diversa sostanza come neurotrasmettitore, ovvero potrebbero rappresentare un caso di falsa negatività.

Numerosi dati sperimentali hanno da tempo dimostrato che nella corteccia cerebrale sono presenti popolazioni numerose di neuroni che utilizzano gli aminoacidi L-aspartato e/o L-glutamato come neurotrasmettitori [17]. Recentemente è stato possibile tracciare alcune proiezioni di questi neuroni impiegando la tecnica autoradiografica introdotta da Streit [16] che ha impiegato come tracciante neuronale selettivo il D- ^3H Aspartato, un analogo triziato dell'aminoacido aspartato. Questa tecnica si basa sulla proprietà dei neuroni che usano aspartato e/o glutamato come neurotrasmettitori di incorporare selettivamente tali sostanze a livello dei loro terminali sinaptici e di trasportarle fino al soma per via assonica retrograda. A livello dei terminali l'assunzione selettiva avviene sia per le forme L che per le forme D di questi aminoacidi. Queste ultime tuttavia, essendo metabolicamente inerti, finiscono con l'accumularsi a livello dei somi cellulari e possono essere messe in evidenza mediante autoradiografia. Impiegando D- ^3H Aspartato come tracciante neuronale è stato dimostrato che gran parte delle proiezioni corticofughe destinate a diversi nuclei e strutture sottocorticali originano da neuroni che utilizzano aminoacidi eccitatori come neurotrasmettitori [2, 8, 11, 14, 15, 16]. Dati sperimentali sui neurotrasmettitori utilizzati dai neuroni cortico-corticali sono invece alquanto limitati. Alcune osservazioni ottenute mediante l'impiego di D- ^3H Aspartato nella corteccia parietale e frontale del ratto [6, 13, 16] e nella corteccia visiva [2] e somestesica del gatto [10] hanno suggerito che anche i neuroni callosali e associativi potrebbero impiegare aminoacidi eccitatori come neurotrasmettitori. In particolare, è stato osservato che numerosi neuroni dell'area somestesica prima (SI), distribuiti prevalentemente negli strati corticali più superficiali, possono essere marcati per via retrograda con D- ^3H Aspartato iniettato nell'area somestesica seconda (SII) dello stesso emisfero [10]. A fine di estendere queste osservazioni sui mediatori chimici impiegati dai neuroni cortico-corticali, sono stati eseguiti i presenti esperimenti nel Gatto con lo scopo di accertare se dopo iniezioni di D- ^3H Aspartato nell'area SI sia possibile marcare per via retrograda neuroni associativi nell'area SII ipsilaterale e neuroni callosali nell'area SI contralaterale.

In 4 gatti adulti anestetizzati con Ketamina (50 mg/ml; 30 mg/Kg i.m.) sono state eseguite iniezioni multiple di una soluzione contenente D- ^3H Asp (3-5 iniezioni di 3 μl ; 250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) e perossidasi di rafano (HRP; 33% in soluzione fisiologica) nell'area SI. Le iniezioni sono state eseguite nel giro sigmoideo

posteriore (zona di rappresentazione del tronco) e nel giro coronale (zona di rappresentazione dell'arto anteriore distale). Trascorse 48-96 ore dalle iniezioni, gli animali venivano perfusi con soluzione fisiologica seguita da una soluzione di glutaraldeide al 5% in tampone fosfato (0.16 M; pH 7.6). I cervelli venivano quindi rimossi e mantenuti nello stesso fissativo per un periodo variabile tra 24 e 72 ore. I cervelli venivano quindi trasferiti in una soluzione crioprotettiva (saccarosio al 30% in tampone fosfato 0.1 M, pH 7.6) per 2 giorni. Trascorso questo periodo i cervelli venivano tagliati al microtomo congelatore in sezioni coronali di 40 μm di spessore. Venivano allestite due serie di sezioni alterne. Una serie è stata trattata per la reazione istochimica della HRP secondo il protocollo di Graham e Karnowsky [7] mentre l'altra serie di sezioni veniva montata su vetrini portaoggetto, idratata ed immersa in emulsione Kodak NTB 2. Queste sezioni venivano quindi lasciate al buio a 4 °C per un tempo variabile tra 4 e 8 settimane ed infine sviluppate in Kodak D-19 e fissate con Ectaflo. In altri 3 animali è stata iniettata solo perossidasi di rafano nelle stesse sedi di SI. Le sezioni ottenute da questi preparati sono state trattate per la reazione istochimica della perossidasi secondo il metodo modificato di Mesulam [12]. Tutte le sezioni istologiche venivano quindi controcolorate con tionina ed osservate al microscopio. La distribuzione dei neuroni marcati e l'estensione della diffusione dei traccianti iniettati venivano riprodotte tramite un X-Y plotter collegato al tavolino traslatore di un microscopio.

Neuroni marcati per via retrograda con HRP o con D- ^3H Asp sono stati rintracciati nell'area SII ipsilaterale (neuroni associativi SII-SI) e nell'area SI contralaterale (neuroni callosali SI-SI). Neuroni marcati con HRP erano inoltre presenti nel complesso ventrobasale ed in alcuni nuclei intralaminari del talamo ipsilaterale. Nessun neurone marcato con D- ^3H Asp è stato invece riscontrato nel talamo ipsilaterale.

Nell'area SII ipsilaterale i neuroni associativi marcati con HRP erano distribuiti topograficamente nella zona di rappresentazione dell'arto anteriore e del tronco [1, 3]. Alcuni di questi neuroni erano anche presenti nell'area 5a, a livello della profondità del solco soprasilviano, [1] ma erano assenti nella porzione laterale del giro ectosilviano anteriore corrispondente all'area SIV. I neuroni HRP-positivi erano prevalentemente concentrati negli strati infragranulari, quasi equamente distribuiti tra gli strati V e VI. Un terzo circa della popolazione dei neuroni marcati con HRP era invece localizzata nel III strato, sia nella porzione profonda che superficiale. Un discreto numero era infine presente anche nel II strato. I neuroni associativi marcati con D- ^3H Asp, chiaramente evidenziabili negli autoradiogrammi per la presenza di granuli di argento ridotto sovrapposti al soma ed ai dendriti prossimali, erano distribuiti nelle stesse regioni dell'area SII che contenevano i neuroni marcati con HRP. La distribuzione laminare dei neuroni marcati con D- ^3H Asp era simile a quella dei neuroni marcati con HRP. La maggioranza di essi infatti era addensata negli strati infragranulari, sia nel V che nel VI strato. A livello degli strati sopra-granulari tuttavia la distribuzione dei neuroni marcati con granuli d'argento ha mostrato una differenza costante e significativa. Questi neuroni infatti erano

concentrati quasi esclusivamente nella porzione esterna del III strato e nel II strato ma, a differenza dei neuroni marcati con HRP, erano eccezionalmente rari nella porzione più interna del III strato.

Nell'area SI dell'emisfero contralaterale i neuroni callosali marcati con HRP erano concentrati quasi esclusivamente nella porzione più mediale del giro sigmoideo posteriore, in una regione corrispondente alla zona di rappresentazione del tronco [9]. In accordo con precedenti dati sperimentali nel giro coronale, corrispondente alla zona di rappresentazione dell'arto anteriore, non erano presenti neuroni callosali marcati con HRP [4]. Nella regione del tronco i neuroni HRP-positivi erano prevalentemente distribuiti nel III strato (specie nelle sue lamine più profonde) che conteneva circa la metà di tutti i neuroni callosali marcati con HRP. Numerosi neuroni callosali erano comunque presenti anche nel VI strato, nonché nel V, ma erano rari nel IV ed assenti nel II. I neuroni callosali marcati con D- ^3H Asp erano distribuiti in modo simile ai neuroni marcati con HRP. Essi infatti erano concentrati nella zona di rappresentazione del tronco ed erano assenti nella zona di rappresentazione dell'arto anteriore. La maggioranza dei neuroni callosali marcati con D- ^3H Asp era concentrata nel VI strato che conteneva oltre la metà di tutti i neuroni callosali marcati con l'aminoacido triziato. Nel III strato invece, specie nella sua porzione più profonda, in cui erano invece particolarmente numerosi i neuroni callosali marcati con HRP, i neuroni marcati con D- ^3H Asp erano alquanto più rari.

I risultati ottenuti mostrano la selettività del D- ^3H Asp nella marcatura retrograda di popolazioni neuronali. Infatti, rispetto ad un marcante neuronale non selettivo come la perossidasi di rafano che ha marcato i neuroni associativi di SII, i neuroni callosali di SI ed i neuroni talamo-corticali del complesso ventrobasale e dei nuclei intralaminari, l'aminoacido triziato ha marcato solo i neuroni cortico-corticali e non quelli di proiezione talamo-corticale. È probabile, come suggerito da precedenti dati sperimentali [2, 5], che la mancata assunzione di D- ^3H Asp a livello dei terminali delle fibre talamo-corticali possa dipendere dal fatto che i neuroni di questa proiezione non possiedono il meccanismo ad alta affinità per l'incorporazione di glutamato ed aspartato in quanto non utilizzano questi aminoacidi come neurotrasmettitore. È da notare che simili risultati sono stati ottenuti nel nucleo genicolato laterale nel gatto da Baughman e Gilbert [2] dove non erano presenti neuroni marcati dopo iniezioni di D- ^3H Asp nella corteccia visiva. Anche nel complesso ventrobasale del Ratto sono stati rintracciati solo rari neuroni marcati con questa sostanza radioattiva dopo iniezioni corticali [13].

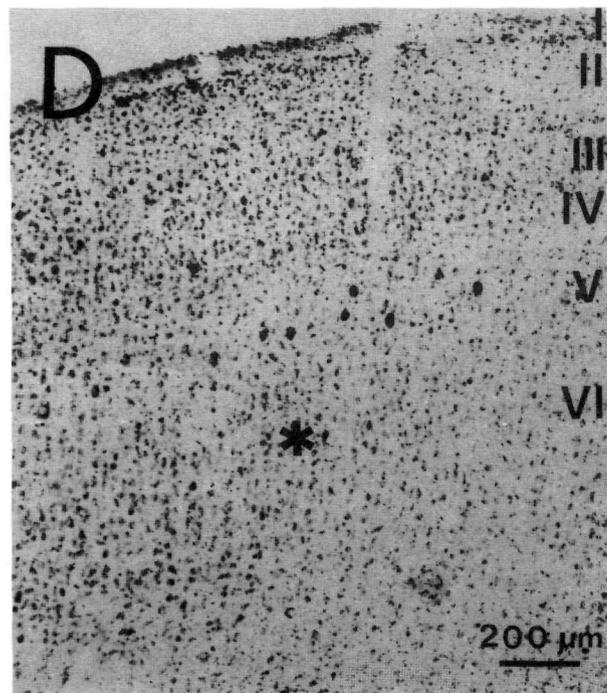
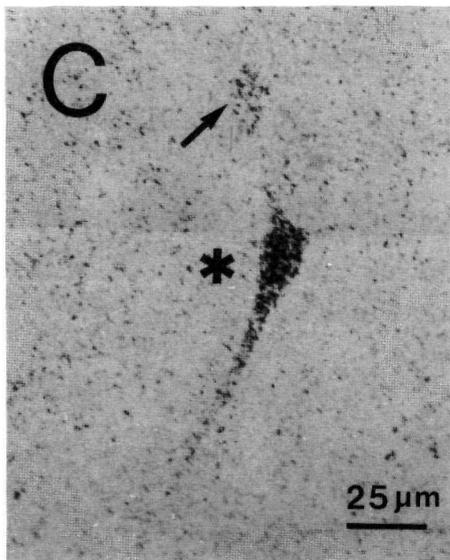
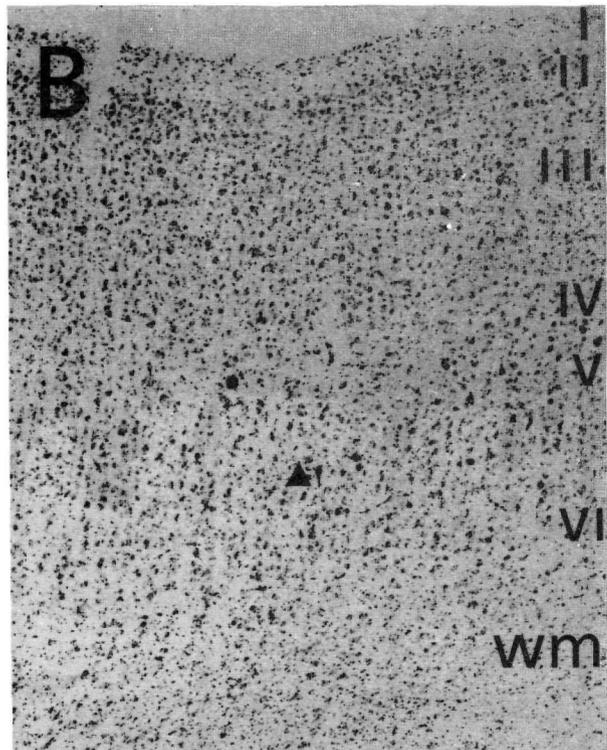
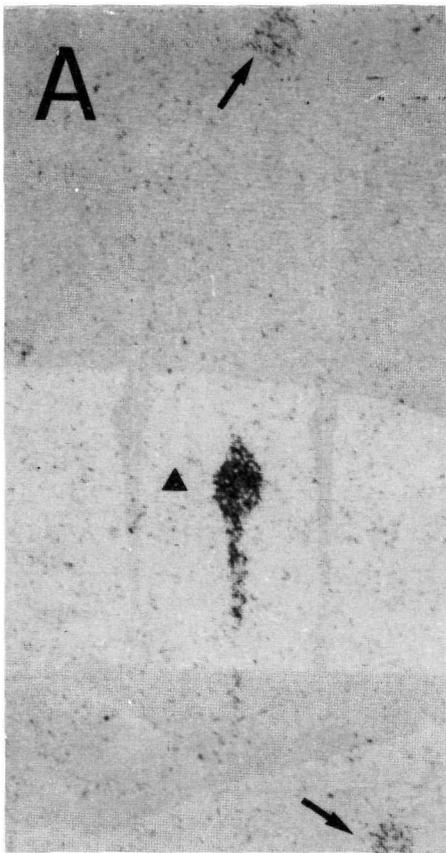
Le stesse iniezioni corticali di D- ^3H Asp che non hanno marcato per via retrograda i neuroni talamici hanno invece marcato numerosi neuroni cortico-corticali, sia nell'area SII ipsilaterale che nell'area SI contralaterale. La distribuzione topografica di questi neuroni era del tutto simile a quella dei neuroni marcati con HRP iniettata nelle stesse sedi dell'area SI. Questa osservazione suggerisce che i due traccianti neuronali, uno non selettivo e l'altro selettivo, sono egualmente efficaci ed affidabili per tracciare le proiezioni neuronali pur-

ché tali proiezioni siano dotate del meccanismo di assunzione specifica per il glutamato e l'aspartato. Le proiezioni cortico-corticali indagate nella presente ricerca possiedono quindi a livello dei terminali sinaptici il meccanismo specifico per l'assunzione dell'aminoacido marcato. È probabile pertanto che queste proiezioni cortico-corticali utilizzino aminoacidi eccitatori come neurotrasmettitore. L'analisi della distribuzione laminare dei neuroni associativi e callosali marcati con HRP e D-[³H]Asp suggerisce tuttavia che non tutti i neuroni delle proiezioni associative SII-SI e della proiezione callosale SI-SI possiedono eguali proprietà biochimiche. Infatti, rispetto ai neuroni marcati con HRP, quelli marcati con l'aminoacido triziato erano particolarmente rari nelle porzioni inferiori del III strato. Una osservazione simile è stata ottenuta in precedenti esperimenti indagando con la stessa tecnica la proiezione associativa SI-SII [10]. La mancata assunzione di D-[³H]Asp da parte dei terminali di gran parte delle cellule cortico-corticali della porzione inferiore del III strato può essere dovuta a diverse ragioni. Si potrebbe ipotizzare in primo luogo che tali cellule non possiedano il meccanismo per incorporare l'aspartato in quanto potrebbero utilizzare altre sostanze chimiche come mediatore sinaptico oppure che tali cellule potrebbero impiegare come mediatore solo il glutamato e non l'aspartato. Non si può escludere l'ipotesi, tuttavia, che lo scarso numero di cellule cortico-corticali marcate nel III strato possa rappresentare un caso di falsa negatività, dipendente dal fatto che tali neuroni, pur utilizzando glutamato e/o aspartato come neurotrasmettitore, potrebbero possedere un meccanismo di assunzione del tutto particolare ed incapace di incorporare il D-[³H]Asp, e/o di trasporto per via retrograda fino al soma cellulare. Ulteriori esperimenti basati su metodi combinati di immunocitochimica e di marcatura retrograda non selettiva potranno confermare se nell'ambito delle proiezioni cortico-corticali delle aree somestetiche del Gatto sussistano due sotto-popolazioni di neuroni, localizzate in diversi strati corticali e che utilizzano due diverse sostanze chimiche come neurotrasmettitore.

BIBLIOGRAFIA

- [1] ALLOWAY K.D. and BURTON H. (1985) - *Homotypical ipsilateral cortical projections between somatosensory areas I and II in the cat*. « *Neuroscience* », 14, 15-35.
- [2] BAUGHMAN R.W. and GILBERT C.D. (1981) - *Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex*. « *J. Neurosci.* », 1, 427-439.
- [3] BURTON H., MITCHELL G. and BRENT D. (1982) - *Second somatic sensory area in the cerebral cortex of cats: somatotopic organization and cytoarchitecture*. « *J. Comp. Neurol.* », 210, 109-135.
- [4] CAMINITI R., INNOCENTI G.M. and MANZONI T. (1979) - *Anatomical substrate of the callosal messages from SI and SII in the cat*. « *Exp. Brain Res.* », 35, 295-314.
- [5] CUÉNOD M., BAGNOLI P., BEAUDET A., RUSTIONI A., WIKLUND L. and STREIT P. (1982) - *Transmitter-specific retrograde labeling of neurons*. In: Chan-Palay V. and Palay S.L. (eds.), *Cytochemical Methods in Neuroanatomy*, Alan Liss, New York, pp. 17-44.

- [6] FISHER B.O., OTTERSEN O.P. and STORM-MATHISEN J. (1982) - *Axonal transport of D-[³H]aspartate in the claustricortical projection*. « *Neuroscience (Suppl. 2)* », S 69.
- [7] GRAHAM R.C.J. and KARNOWSKY M.J. (1966) - *The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique*. « *J. Histochem. Cytochem.* », 14, 291-302.
- [8] JONES E.G. (1985) - *The Thalamus*, XVII, 935, Plenum Press, New York.
- [9] MANZONI T., BARBARESI P., BELLARDINELLI E. and CAMINITI R. (1980) - *Callosal projections from the two body midlines*. « *Exp. Brain Res.* », 39, 1-9.
- [10] MANZONI T., BARBARESI P. and FABRI M. (1986 a) - *D-[³H]Aspartate retrograde labelling of association neurones in area SI of the cat*. « *Neurosci. Lett.* », 67, 175-180.
- [11] MATUTE C. and STREIT P. (1985) - *Selective retrograde labeling with D-[³H]aspartate in afferents to mammalian superior colliculus*. « *J. Comp. Neurol.* », 241, 34-49.
- [12] MESULAM M.M. (1978) - *Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: A non carcinogenic blue reaction product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents*. « *J. Histochem. Cytochem.* », 26, 160-177.
- [13] OTTERSEN O.P., FISHER B.O. and STORM-MATHISEN J. (1983) - *Retrograde transport of D-[³H]Aspartate in thalamocortical neurones*. « *Neurosci. Lett.* », 42, 19-24.
- [14] RUSTIONI A. and CUÉNOD M. (1982) - *Selective retrograde transport of D-aspartate in spinal interneurons and cortical neurons of rats*. « *Brain Res.* », 236, 143-155.
- [15] RUSTIONI A., SCHMECHEL D.E., SPREAFICO R., CHEEMA S. and CUENOD M. (1983) - *Excitatory and inhibitory amino acid putative neurotransmitters in the ventralis posterior complex: an autoradiographic and immunocytochemical study in rats and cats*. In: G. MACCHI, A. RUSTIONI and R. SPREAFICO (eds.) *Somatosensory Integration in the Thalamus*, Elsevier, Amsterdam, pp. 365-383.
- [16] STREIT P. (1980) - *Selective retrograde labeling indicating the transmitter of neuronal pathways*. « *J. Comp. Neurol.* », 191, 429-463.
- [17] STREIT P. (1984) - *Glutamate and aspartate as transmitter candidates for systems of the cerebral cortex*. In: E.G. JONES and A. PETERS (eds.) *Cerebral Cortex, Vol. 2, Functional properties of cortical cells*, Plenum Press, New York, pp. 119-143.



A e C, microfotografie di alcuni neuroni callosali del VI strato dell'area SI (zona di rappresentazione del tronco) marcati in via retrograda con D-[³H]Aspartato iniettato nella zona omologa dell'area SI contralaterale (preparato con D-[³H]Aspartato). B e D, microfotografie della corteccia dell'area SI in cui sono indicati con un triangolo ed un asterisco, gli stessi neuroni mostrati in A e C (preparato controcolorato con tionina)