

**SCUOLA  
PER TERAPISTI DELLA RIABILITAZIONE**

**ISTITUTO SANTO STEFANO  
PORTO POTENZA PICENA**

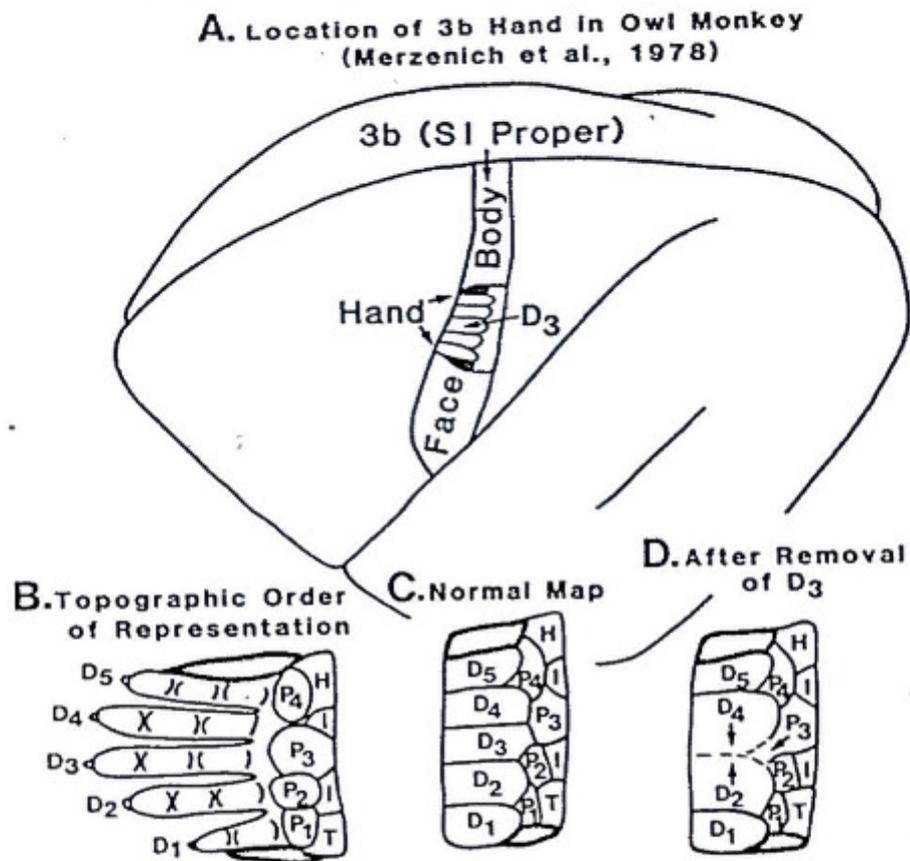
**Glutamato e riorganizzazione plastica  
della corteccia cerebrale  
in seguito a lesioni centrali:  
Uno studio sperimentale nella scimmia**

**CANDIDATA:  
MANUELA EMILI**

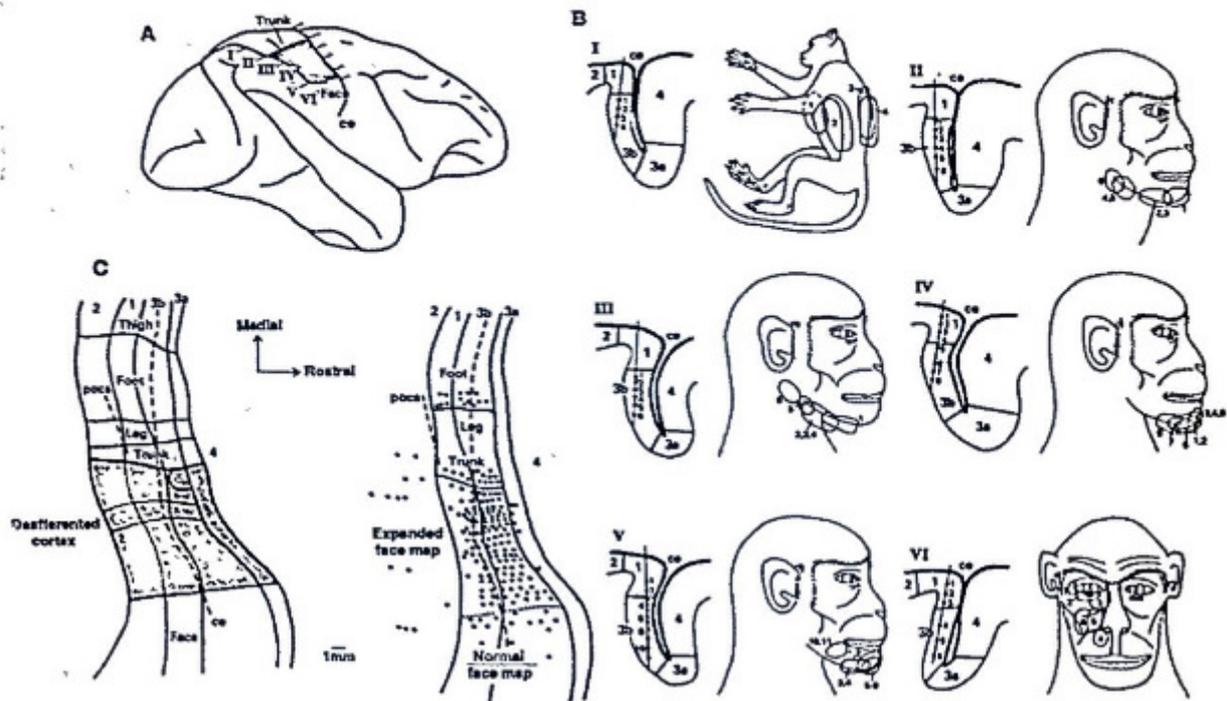
**RELATORE:  
Dott. FIORENZO CONTI**

**Anno Accademico 1992 - 1993**

All'inizio degli anni '80, Michael Merzenich e John Kaas ed i loro collaboratori del Department of Otorhinolaryngology della University of California at San Francisco e del Department of Psychology della Vanderbilt University di Nashville hanno studiato gli effetti acuti e cronici della sezione del nervo mediano sulla rappresentazione corporea delle aree 3b ed 1 dell'area somestesica prima (SI) della corteccia cerebrale della scimmia (Merzenich e Kaas, 1982; Kaas et al., 1983; Merzenich et al., 1983 a e b Merzenich et al., 1988; Kaas et al., 1991). Questi esperimenti hanno dimostrato che, dopo un periodo di silenzio neuronale, nell'area deprivata è possibile evidenziare una "nuova" rappresentazione, che di fatto è un'espansione della rappresentazione situata nelle regioni adiacenti. In altre parole, quella porzione corticale non riceve più informazioni dai recettori che fanno capo al nervo tagliato, ma viene occupata dalla rappresentazione delle regioni periferiche vicine (Figura 1). Questi esperimenti, ripetuti nel sistema somatosensoriale utilizzando una vasta gamma di modificazioni periferiche - dal taglio di un nervo alla sua legatura o al suo schiacciamento, dall'amputazione di un dito alla fusione di due dita adiacenti (cfr. Kaas, 1991) - sono stati confermati anche in altre sistemi sensoriali, come il sistema visivo ed uditivo (Kaas, 1991).



*Figura 1. Riorganizzazione della zona di rappresentazione della mano dell'area SI della scimmia dopo amputazione del 3° dito. A-C illustrano la normale topografia della rappresentazione delle dita nell'area SI. D illustra l'espansione delle regioni di rappresentazione del 2° e del 4° dito (Da Kaas ed al., 1983).*



**Figura 2.** Riorganizzazione massiva dell'area SI dopo estesa deafferentazione dell'arto superiore (rizotomia cervicale completa bilaterale). A mostra l'estensione della zona deafferentata (in scuro) ed i livelli medio-laterali (I-VI) in cui sono state effettuate le registrazioni microelettrodiche illustrate in B, che mostrano come la zona di rappresentazione della mano sia ora occupata dall'espansione della rappresentazione della faccia. C e D illustrano con maggiori dettagli l'estensione della zona deafferentata (a sinistra) e la densità delle penetrazioni microelettrodiche (a destra). (Da Pons ed al., 1991).

*Negli esperimenti eseguiti nel sistema somatosensoriale, l'entità della riorganizzazione si è rivelata piuttosto limitata (1-2 mm) e si è postulato che la riorganizzazione corticale sia dovuta ad un processo di slatentizzazione di afferenze silenti, normalmente inespresse (Merzenich et al., 1988; Kaas, 1991; cfr. Wall, 1977). Recentemente, Tim Pons ed i suoi collaboratori del Laboratory of Neuropsychology del National Institute of Mental Health di Bethesda, MD, hanno studiato l'organizzazione topografica dell'area SI in scimmie che dodici anni prima erano state sottoposte a rizotomia dorsale di tutti i segmenti cervicali del midollo spinale (Pons et al., 1991). Questi esperimenti hanno dimostrato che l'entità della riorganizzazione può essere notevolmente superiore ai limiti sopra citati (Pons et al., 1991; vedi anche Garraghty e Kaas, 1991): in particolare, si evidenziò una riorganizzazione dell'ordine di alcuni centimetri, in quanto effettuando l'esplorazione microelettrodica della "vecchia" zona di rappresentazione della mano fu messo in evidenza che quella parte di corteccia rispondeva ora alla stimolazione dei recettori tattili della faccia (Figura 2).*

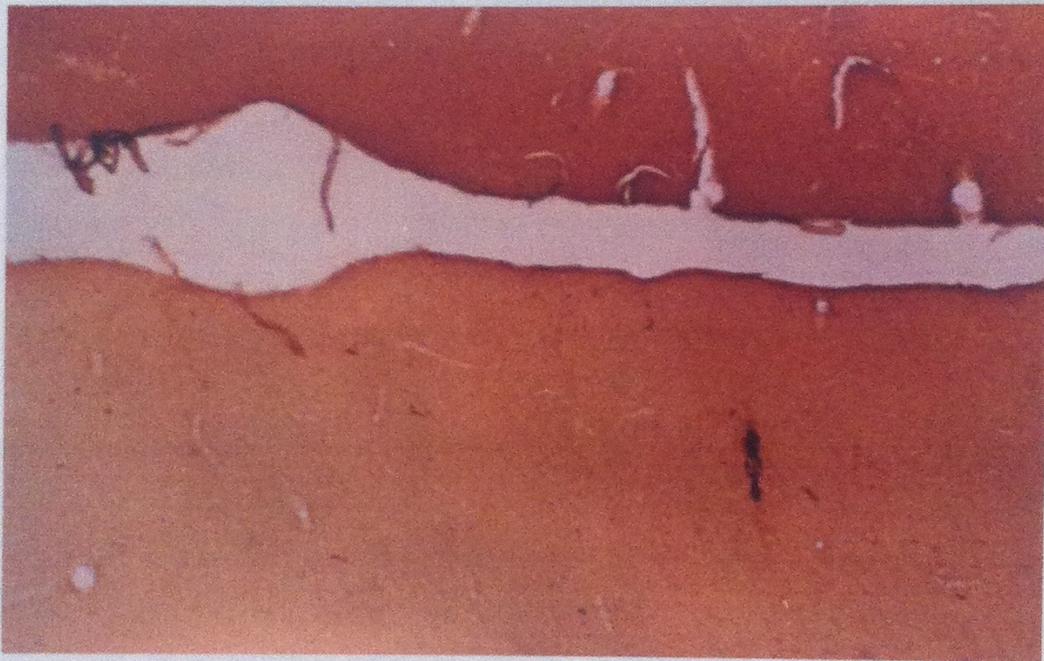
*Se l'entità della riorganizzazione può raggiungere alcuni centimetri, come dimostrato da Tim Pons e collaboratori, l'ipotesi della slatentizzazione delle afferenze silenti non è più sufficiente, in quanto l'arborizzazione terminale di un singolo assone talamo-corticale può raggiungere 1 mm (Garraghty e Sur, 1990). E' stato recentemente dimostrato che i livelli corticali di vari neurotrasmettitori e dei loro recettori dipendono soprattutto dal grado*

di attività afferente al sistema (LaMotte et al., 1976; Ninkovic et al., 1981; Baker et al., 1983; Black et al., 1984; Kantner et al., 1985; Wu e Black, 1988; Schoups e Black, 1991). Ad esempio, la rimozione di un occhio comporta la scomparsa di immunoreattività per l'acido  $\gamma$ -amino butirrico (GABA) e per alcuni neuropeptidi nelle colonne di dominanza oculare relative all'occhio rimosso nella corteccia visiva primaria (area 17) della scimmia (Hendry e Jones, 1986, 1988; Hendry et al., 1988). E' possibile pertanto che le variazioni dei livelli di alcuni neurotrasmettitori e dei loro recettori possano attivare complessi meccanismi intracellulari che determinano la riorganizzazione funzionale.

L'amino acido L-glutamato (Glu) è il più diffuso neurotrasmettitore eccitatorio della corteccia cerebrale dei mammiferi, com'è dimostrato da numerosi esperimenti elettrofisiologici, farmacologici e neuroanatomici (Fonnum, 1984; Streit, 1984; Conti, 1991). L'introduzione delle tecniche immunocitochimiche ha permesso di definire con maggior precisione l'organizzazione del sistema Gluergico ed ha messo in evidenza che 30-50% dei neuroni della corteccia cerebrale utilizzano Glu come neurotrasmettitore (Conti et al., 1987, 1988a, 1989; Conti, 1991). Oltre ad essere di gran lunga il neurotrasmettitore più diffuso nella corteccia cerebrale ed a mediare la trasmissione degli impulsi afferenti ed intracorticali, il Glu svolge anche un ruolo particolare nella fisiologia della corteccia, com'è dimostrato dal suo coinvolgimento nei processi di sviluppo (Watkins e Collingridge, 1989) e nella

*long term potentiation (LTP; Bliss e Collingridge, 1993; Artola e Singer, 1987, 1990; Tsumoto, 1992), un modello cellulare dei processi di apprendimento e memoria (Bliss e Collingridge, 1993).*

*L'ipotesi che il Glu possa essere implicato nei fenomeni di riorganizzazione plastica della corteccia cerebrale in seguito a lesioni periferiche è stata verificata in una serie di esperimenti nei quali il sistema nervoso centrale di scimmie sottoposte al taglio dei tre nervi dell'avambraccio è stato studiato per l'evidenziazione immunocitochimica del Glu (Conti et al., 1992). Questo studio ha dimostrato che a livello spinale, bulbare e talamico non erano evidenziabili differenze tra il lato sperimentale ed il lato normale. Questo fatto non esclude che queste strutture possano partecipare ai processi di riorganizzazione, ma è indice che in quelle condizioni sperimentali non si riscontrano variazioni dei livelli di Glu. Nell'area somestesica prima (SI) dell'emisfero contralaterale all'arto operato, il numero, la morfologia e la distribuzione dei neuroni Glu-positivi erano simili a quelli dell'analoga area dell'emisfero ipsilaterale all'arto operato ed a quelli descritti in studi precedenti effettuati in animali normali (Conti et al., 1987, 1988 a e c, 1989). Numerosi neuroni Glu-positivi erano infatti presenti in tutti gli strati corticali, anche se il loro numero era maggiore negli strati II-III e V-VI. Nell'area somestesica seconda (SII) contralaterale all'arto operato erano presenti, nella zona di rappresentazione della mano, regioni nelle quali non erano evidenziabili*



*Figura 3. Scomparsa dei neuroni glutamato-positivi nell'area SII di una scimmia 7 settimane dopo il taglio dei nervi dell'avambraccio contralaterale. Si noti la presenza di una traccia lasciata dal microelettrodo che ha esplorato la regione, non trovando neuroni che rispondevano alla stimolazione tattile dell'arto superiore (Da Conti ed al., 1992).*

neuroni Glu-positivi, anche se le regioni circumvicine (in cui sono rappresentate altre zone del corpo) esibivano una normale distribuzione di neuroni Glu-positivi (Figura 3). Lo studio di sezioni adiacenti, colorate con la tecnica di Nissl o trattate per l'evidenziazione dell'enzima citocromo ossidasi, metteva in risalto che la regione priva di neuroni Glu-positivi era del tutto normale dal punto di vista citoarchitettonico e metabolico. In quella regione, infatti, i neuroni erano presenti ed apparivano normali, ma essi non esprimevano più quantità di glutamato tali da raggiungere la soglia dell'evidenziazione immunocitochimica. Nell'area SII dell'emisfero opposto (ipsilaterale all'arto operato), invece, il numero dei neuroni Glu-positivi era simile a quello precedentemente descritto e non erano evidenziabili "isole" prive di neuroni Glu-positivi.

La ragione per cui i neuroni non producono più Glu, o lo producono in quantità inferiori, è presumibilmente legata alla riduzione dell'attività afferente. In qualunque neurone, infatti, la riduzione delle afferenze determina una serie di modificazioni biochimiche che inducono una diminuzione (o la cessazione) della sintesi di proteine ed enzimi. Quando invece l'attività afferente viene ripristinata, avvengono modificazioni di segno opposto, che tendono a riattivare tutti i meccanismi biosintetici del neurone. Le modificazioni osservate nell'area SII sono quindi presumibilmente legate alla riduzione delle afferenze destinate a quei neuroni.

*Le variazioni dei livelli di Glu evidenziabili nell'area SII hanno posto le basi per correlare , nello stesso animale ed a volte nella stessa sezione, i dati immunocitochimici con quelli elettrofisiologici. Confrontando le due serie emerge che, quando la corteccia si è riorganizzata (come nel caso dell'area SI) l'attività dei neuroni glutamatergici è normale, indipendentemente dal fatto che in quella regione di corteccia cerebrale vi sia la rappresentazione della mano o della faccia, mentre quando la corteccia non è ancora riorganizzata (come nel caso di SII) i neuroni glutamatergici non sono attivi. In altre parole, si può ipotizzare che la presenza di una normale marcatura immunocitochimica dei neuroni glutamatergici corticali dipenda dal tempo di sopravvivenza, cioè dal periodo di tempo che intercorre fra la sezione dei nervi ed il sacrificio (Conti et al., 1992). Secondo questa ipotesi, confermata da alcuni esperimenti preliminari effettuati sulla scimmia, riducendo il tempo di sopravvivenza scomparirebbero totalmente i neuroni glutamatergici anche nell'appropriata regione dell'area SI e presumibilmente anche nel talamo od in altre strutture sottocorticali; aumentando invece sensibilmente il tempo di sopravvivenza (ad esempio fino a 6-8 mesi) ricomparirebbero i neuroni glutamatergici nell'area SII.*

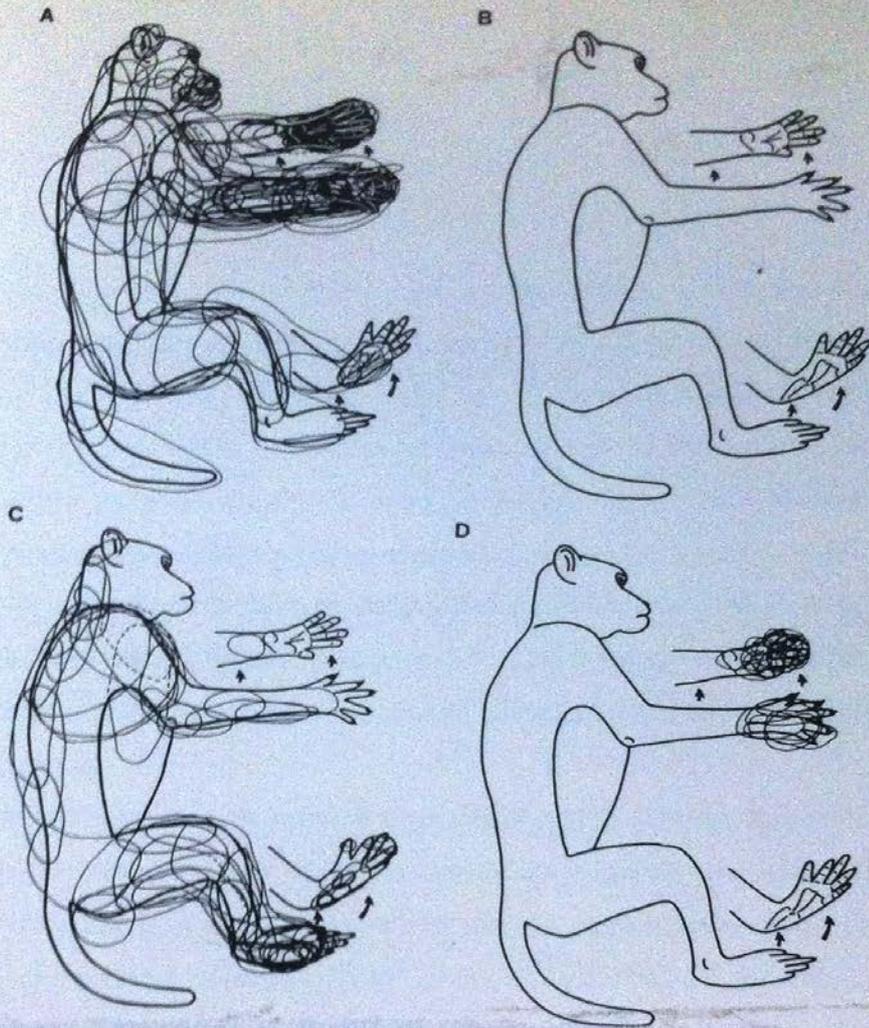
*La dimostrazione di un coinvolgimento del sistema Gluergico nei fenomeni di riorganizzazione corticale non prova necessariamente che l'ipotesi della slatentizzazione non sia valida, ma suggerisce la possibilità che esistano*

*vani meccanismi alla base della notevole capacità di riorganizzazione della corteccia cerebrale.*

*Allo stato attuale non esistono dati sull'applicabilità generale di questi risultati sperimentali; in particolare non sono ancora stati effettuati esperimenti tesi a verificare se variazioni dei livelli di neurotrasmettitori si verificano anche in seguito a lesioni del sistema nervoso centrale. Anche in questo caso, il sistema somestesico offre un eccellente modello sperimentale, in quanto, oltre ad una ricchissima letteratura sulle connessioni che tra le aree SI ed SII (Manzoni ed al., 1986; Kaas e Pons, 1988), in questo sistema è stato per la prima volta dimostrato che un'area secondaria (l'area SII) dipende criticamente dall'area primaria (l'area SI) per la sua attivazione (Pons et al., 1987).*

*Tim Pons ed i suoi collaboratori hanno infatti dimostrato che l'ablazione della zona di rappresentazione della mano dell'area SI (che corrisponde alle aree citoarchitettoniche 3a, 3b, 1, 2) determina l'inattivazione funzionale dei neuroni situati nella zona di rappresentazione della mano dell'area SII dell'opercolo parietale (Pons et al., 1987; Figura 4).*

*Risultati del tutto diversi a quelli sopra riportati sono stati riscontrati negli emisferi studiati 6-8 settimane dopo l'ablazione della stessa regione di SI. In questi casi, i neuroni dell'area SII che precedentemente rispondevano alla stimolazione tattile della mano, rispondono ora all'attivazione dei meccanocettori situati nella cute del piede. E' stato calcolato che la zona di rappresentazione del piede subisce una massiccia espansione: da un'area che*



**Figura 4.** Le risposte dei neuroni dell'area SII alla stimolazione tattile della periferia dipendono dalle afferenze che originano dall'area SI. **A** mostra tutti i campi recettivi periferici (CRP) registrati da neuroni dell'area SII di 3 scimmie normali. Si noti l'elevato numero di CRP relativi alla mano. **B**, in seguito ad un'ablazione completa dell'area SI non si registrano più CRP nell'area SII, mentre ablazioni limitate alla zona della mano o alla zona della faccia, del tronco e dell'arto inferiore determinano, rispettivamente, la scomparsa di neuroni con CRP localizzati alla mano (**C**) o alla faccia, al tronco ed all'arto inferiore (**D**). (Da Pons ed al., 1987).

costituiva solo il 5-10% di SII si è passati ad un'area di rappresentazione che è valutabile tra il 30 ed il 50% della totalità di SII (Pons et al., 1988). Questi risultati dimostrano, pertanto, che il sistema nervoso centrale possiede importanti potenzialità plastiche anche in seguito a lesioni centrali e lasciano intravedere la possibilità che aree di ordine superiore possano avere una capacità plastica post-lesionale ancor più elevata.

Essendo i processi corticali organizzati in maniera analoga in tutte le modalità sensoriali, le presenti scoperte hanno messo in luce che tutte le aree sensoriali possiedono anche nell'adulto un inatteso grado di riorganizzazione post-lesionale.

Riassumendo, una serie di importanti esperimenti eseguiti negli ultimi 10 anni ha dimostrato che la corteccia cerebrale possiede una notevole capacità di riorganizzazione in seguito a lesioni sia del sistema nervoso centrale che di quello periferico. Com'è stato precedentemente ricordato, è possibile evidenziare variazioni di livelli di Glu in seguito a lesioni periferiche. Gli esperimenti eseguiti nella presente ricerca sono stati intrapresi allo scopo di verificare l'ipotesi che anche in seguito a lesioni centrali si possano mettere in evidenza variazioni dei livelli intracitoplasmatici di Glu.

## MATERIALI e METODI

Gli esperimenti sono stati eseguiti su tre scimmie adulte del genere macaco (Rhesus), di entrambi i sessi e di peso variabile tra i 6,5 ed i 8,2 kg. Il disegno sperimentale prevedeva l'ablazione totale e selettiva della zona di rappresentazione della mano dell'area SI e, dopo un periodo di circa 6-8 settimane, una seduta di registrazione elettrofisiologica. Al termine di quest'ultima, gli animali venivano sacrificati, il cervello rimosso dalla scatola cranica e sezionato per l'ottenimento di sezioni istologiche (vedi sotto). La prima e la seconda parte (ablazione dell'area SI ed elettrofisiologia) sono state effettuate presso il Laboratory of Neuropsychology dei National Institute of Mental Health di Bethesda, MD (USA) dal Dr. T.P. Pons, mentre la terza e la quarta parte del protocollo sperimentale (istologia ed immunocitochimica) sono state effettuate presso l'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Ancona.

Ablazione di SI. Le scimmie venivano anestetizzate (Ketalar, 50 mg/kg i.m.) e, in condizioni di sterilità e dopo iniezione topica di anestetico locale, veniva aperta la scatola cranica in corrispondenza del lobo parietale. Si procedeva quindi all'apertura della dura madre ed all'evidenziazione del solco centrale, che costituisce il limite anteriore dell'area SI. A questo punto si effettuava una registrazione elettrofisiologica extracellulare con

*microelettrodi di tungsteno per identificare i limiti mediale e laterale dell'area di rappresentazione della mano (per i dettagli vedi Pons et al., 1985) e, definiti questi limiti, si provvedeva all'ablazione per suzione dell'intera regione. La scatola cranica veniva quindi chiusa con lo stesso frammento osseo previamente rimosso e la cute suturata. Le scimmie venivano riportate nelle loro gabbie e riprendevano le loro normali attività per un periodo di tempo variabile da sei ad otto settimane. Trascorso questo tempo, gli animali venivano ri-anestetizzati e successivamente montati su un apparecchio stereotassico. In condizioni di assoluta sterilità, il cranio veniva rasato, la cute cranica incisa e si procedeva alla rimozione di una piccola porzione di teca cranica e della sottostante dura madre, al fine di permettere la visualizzazione dell'appropriata regione dell'opercolo parietale corrispondente all'area SII..* A questo punto si procedeva all'esplorazione microelettrodica.

***Registrazione elettrofisiologica.** Sono stati utilizzati microelettrodi di tungsteno assotigliati elettroliticamente ed isolati con resina epossidica tranne che alla punta che rimaneva scoperta per circa 5-10  $\mu\text{m}$ . Gli elettrodi venivano affondati nella regione di rappresentazione della mano dell'area SII. Gli elettrodi venivano avanzati elettronicamente fino ad una profondità di circa 400-500  $\mu\text{m}$  dalla superficie piaie. Per determinare la localizzazione e l'estensione dei campi recettivi periferici, nonché la modalità di attivazione, sono stati utilizzati stimoli naturali come la dislocazione meccanica dei peli, eseguita manualmente o con deboli getti d'aria, toccamenti leggeri della cute,*

pressione sui tessuti e manipolazione di tessuti profondi. Per ogni gruppo di neuroni (cioè per ogni penetrazione microelettrodica) veniva delimitato il campo recettivo periferico, che era poi riprodotto su apposite figurine. Al termine delle penetrazioni veniva eseguita una piccola lesione elettrolitica facendo passare corrente attraverso la punta del microelettrodo (5-7  $\mu$ A x 5 sec.). In ogni animale veniva eseguito un numero di penetrazioni variabile da 16 a 34, e comunque sempre sufficiente ad esplorare dettagliatamente tutta la porzione dell'area SII deputata alla rappresentazione della mano. Al termine della seduta di registrazione, gli animali venivano sacrificati per perfusione intraaortica, eseguita dapprima con soluzione fisiologica e successivamente con 4% carbodiimide (Sigma). I cervelli venivano quindi rimossi dalla scatola cranica, post-fissati in una soluzione contenente 4% paraformaldeide per 6-7 giorni ed infine sezionati.

**Preparazione istologica.** Dal cervello di ogni animale venivano preparati blocchi contenenti: il complesso ventroposteriore del talamo, l'area somestesica prima, e l'area somestesica seconda. Per ogni blocco venivano allestite al microtomo congelatore tre diverse serie di sezioni, una delle quali conteneva fette dello spessore di 30  $\mu$ m, mentre le rimanenti due erano costituite da sezioni spesse 50  $\mu$ m. Le sezioni di 30  $\mu$ m sono state utilizzate per l'evidenziazione immunocitochimica del glutamato, mentre quelle da 50  $\mu$ m venivano colorate con la tecnica di Nissl o trattate per l'evidenziazione istochimica dell'enzima citocromo ossidasi secondo un protocollo

*precedentemente descritto (Conti ed al., 1988 b). Le sezioni utilizzate per l'immunocitochimica del glutamato (vedi Conti et al., 1987, per dettagli) venivano lavate in soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS) ed incubate dapprima in siero normale di pecora (NSS; 2% in PBS) e successivamente in anticorpo primario (diluizione 1:6.000 - 1:8.000) per circa 12 ore. Al termine dell'incubazione in anticorpo primario, le sezioni venivano lavate in PBS, incubate per 1 ora in una soluzione contenente un anticorpo secondario - cioè diretto contro l'anticorpo primario - biotilinato (bGAR) specifico, lavate di nuovo. Al termine di questo secondo lavaggio, le sezioni venivano trasferite in una soluzione contenente i reagenti per l'evidenziazione della reazione avidina-biotina (ABC; Hsu et al., 1981) ed ivi mantenute per un'ora, trascorsa la quale si procedeva ad un ulteriore lavaggio ed infine alla incubazione in diaminobenzidina ed perossido di idrogeno per 5-7 minuti per rendere visibile il prodotto della reazione immunitaria. Dopo un ultimo lavaggio in PBS, le sezioni venivano asciugate all'aria, montate su vetrini cromallumati e coperte con un vetrino coprioggetti con DPX. Le sezioni utilizzate per la visualizzazione dell'enzima mitocondriale citocromo ossidasi (un marker del metabolismo energetico atto a differenziare regioni citoarchitettoniche diverse, in aggiunta o in alternativa alla classica colorazione di Nissl) venivano trattate secondo un protocollo precedentemente descritto (Conti et al., 1988a). Le sezioni utilizzate per la colorazione di Nissl*

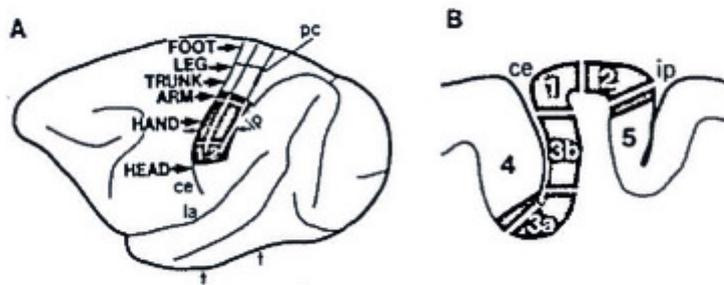
venivano incubate in 0.1% tionina. Anche in questi ultimi due casi, le sezioni venivano montate su vetrini, lasciate asciugare all'aria, e montate con DPX.

In questo modo si ottenevano tre delle serie di sezioni adiacenti, delle quali una era stata trattata per la visualizzazione immunocitochimica del glutamato, una per la istochimica della citocromo ossidasi ed una colorata con la tecnica di Nissl. In ogni caso sperimentale, tutte le sezioni venivano poi esaminate al microscopio (Leitz Orthoplan) e le sezioni rilevanti fotografate.

## RISULTATI

### Verifica istologica della localizzazione e dell'estensione delle lesioni

*In tutti gli animali, l'esame istologico di sezioni parasagittali dell'area SI colorate con la tecnica di Nissl ha confermato che l'estensione dell'ablazione era del tutto coincidente con le intenzioni ed interessava tutta l'estensione rostro-caudale della zona di rappresentazione della mano dell'area SI, dall'area 3a all'area 2, con un trascurabile interessamento della parte dell'area 4 che confina con l'area 3a nel fondo del solco centrale e della frangia rostrale dell'area 5 (Figura 5).*

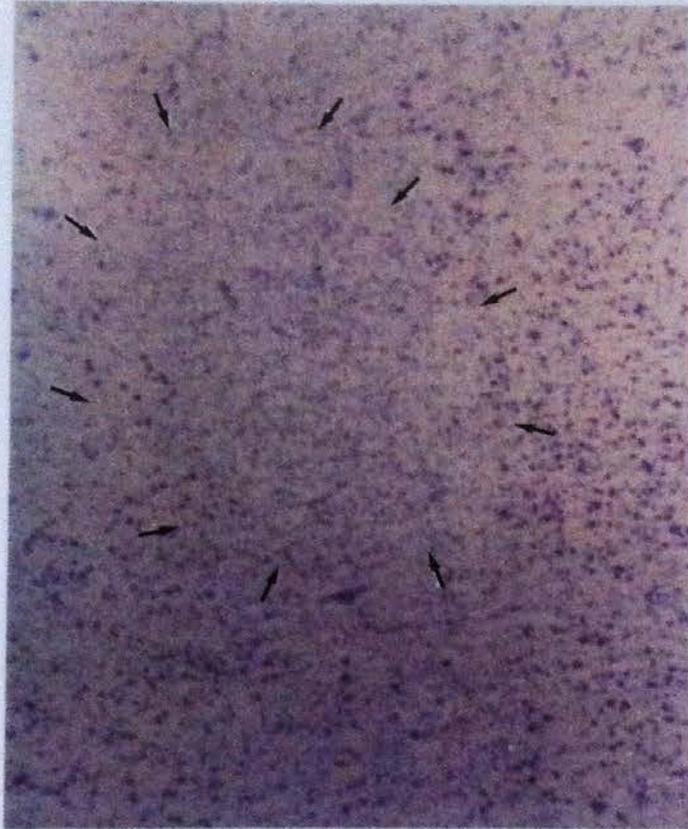


**Figura 5.** Rappresentazione schematica dell'estensione dell'ablazione della mano dell'area SI. A, vista laterale; B, ricostruzione in una sezione parasagittale. ce, solco centrale, ip, solco intraparietale, la, solco laterale, pc, affossamento post-centrale.

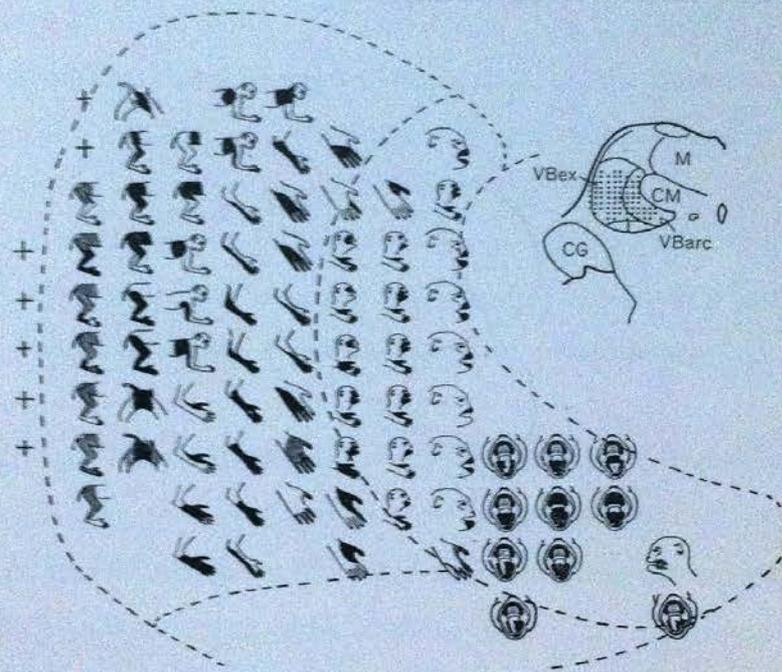
*La localizzazione della lesione nella zona di rappresentazione della mano dell'area SI è stata confermata dallo studio di sezioni coronali del diencefalo trattate per l'evidenziazione istochimica dell'enzima citocromo ossidasi o colorate con la tecnica di Nissl. Le sezioni della prima serie (citocromo ossidasi) mostravano, infatti, una regione talamica totalmente priva di reazione istochimica (Figura 6), mentre le sezioni della seconda serie (Nissl) esibivano, nella stessa regione, una degenerazione della maggior parte degli elementi cellulari, soprattutto di quelli di maggiori dimensioni (Figura 7).*



**Figura 6.** *Microfotografia di una sezione coronale di talamo di una scimmia con ablazione della zona di rappresentazione della mano dell'area SI trattata per l'evidenziazione istochimica dell'enzima citocromo ossidasi. L'area delimitata dalle frecce è priva di attività enzimatica.*



*Figura 7. Microfotografia di una sezione coronale di talamo di una scimmia con ablazione della zona di rappresentazione della mano dell'area SI colorata con la tecnica di Nissl. Le frecce delimitano la regione nella quale sono scomparsi i neuroni.*



**Figura 8.** La rappresentazione della periferia sensoriale nel complesso ventroposteriore del talamo di scimmia (Da Mountcastle e Hennemann, 1952).

*Questa regione era situata nella porzione più mediale della suddivisione laterale del complesso ventroposteriore (Figura 6), ovvero in quella regione del talamo dorsale nella quale l'analisi elettrofisiologica ha ripetutamente localizzato la rappresentazione della mano (Mountcastle e Hennemann, 1952; Jones ed al., 1982; Figura 8).*

*L'insieme dei controlli sopra riportati indica chiaramente che la lesione interessava totalmente ed esclusivamente la zona di rappresentazione della mano dell'area SI.*

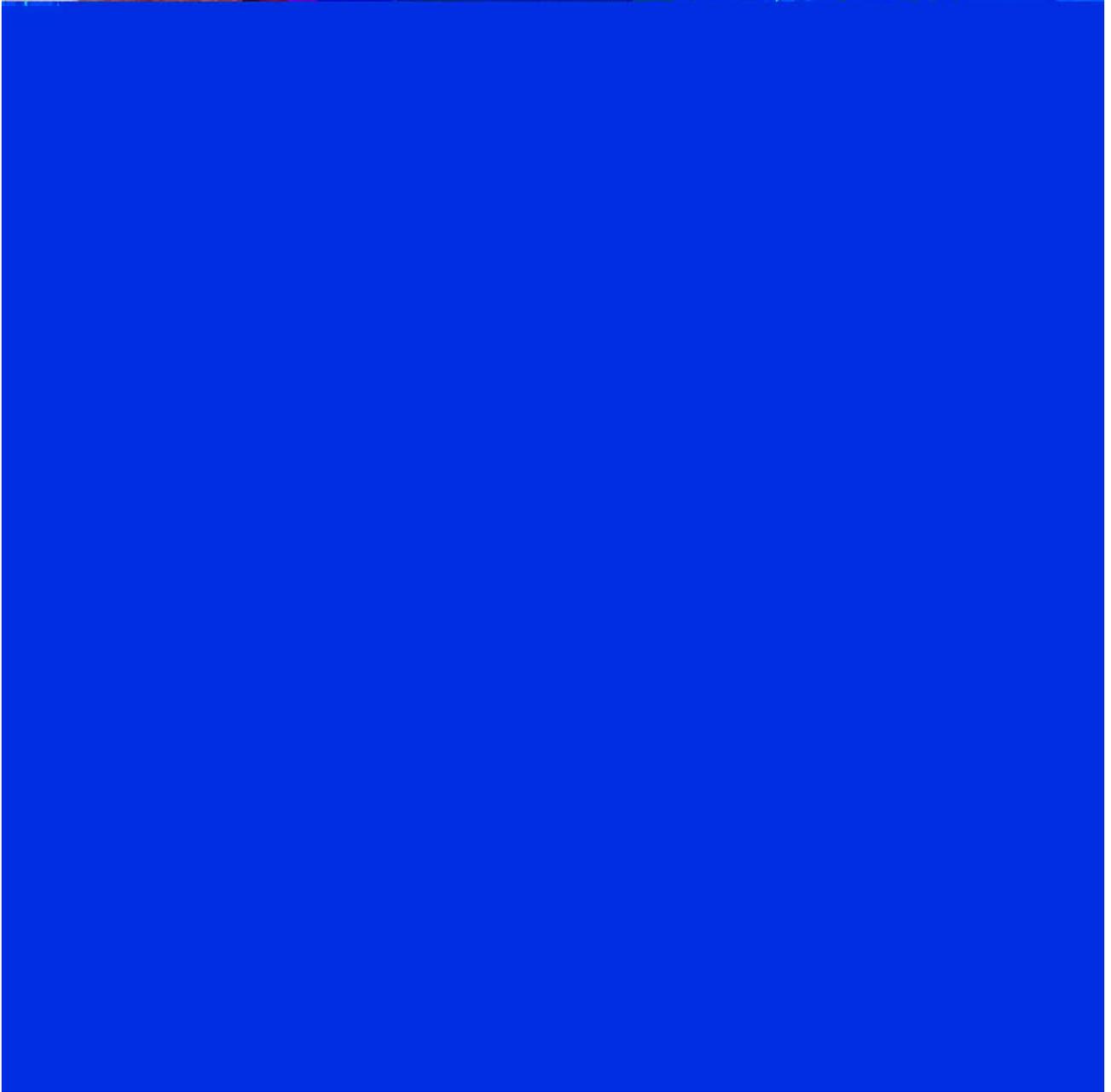
***Distribuzione dei neuroni glutamato-positivi nell'area SI  
contralaterale e nel complesso ventroposteriore.***

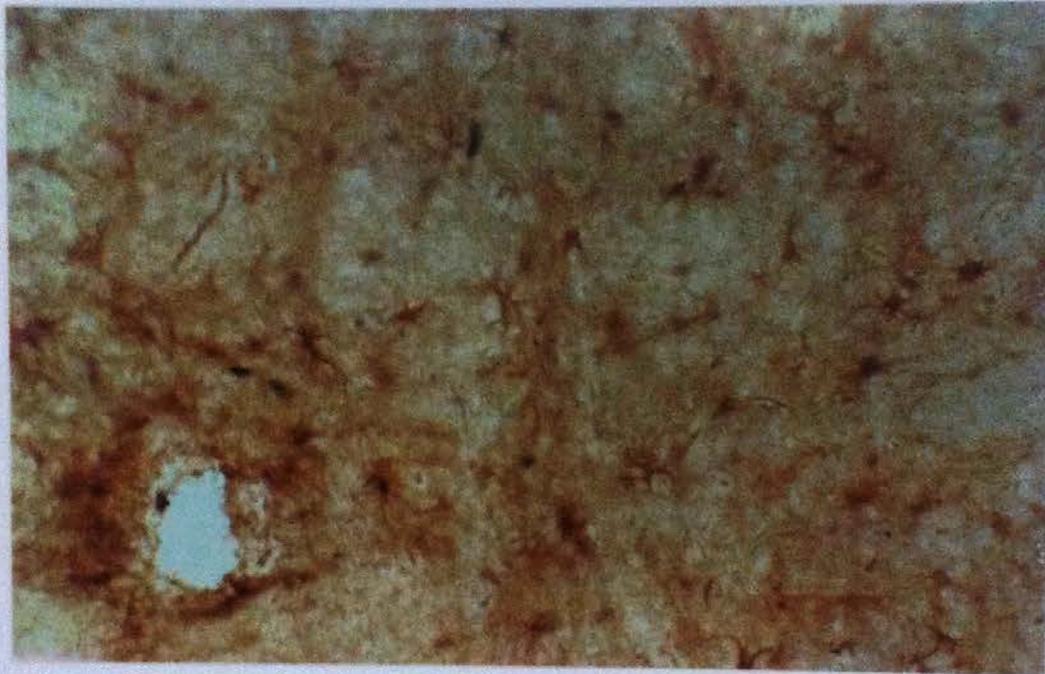
*Nell'area SI contralaterale all'emisfero leso, numerosi neuroni glutamato-positivi erano presenti in tutte le suddivisioni citoarchitettoniche dell'area SI. Questi neuroni erano presenti in tutti gli strati corticali, ma erano di gran lunga più numerosi negli strati II-III e V-VI. Pur non essendo stata effettuata una rigoroso studio quantitativo, l'analisi di queste sezioni permette di concludere che la distribuzione dei neuroni glutamato-positivi nell'area SI contralaterale era del tutto simile a quella precedentemente descritta in scimmie normali (Conti et al., 1987) e, perciò, suggerisce che l'ablazione della zona di rappresentazione della mano dell'area SI non comporta variazioni*

*del numero e della distribuzione laminare dei neuroni glutamato-positivi nell'emisfero contralaterale.*

*Al contrario, nel complesso ventroposteriore del talamo le caratteristiche generali della marcatura immunocitochimica erano del tutto diverse da quelle descritte in scimmie normali e, soprattutto, da quelle evidenziabili nel complesso ventroposteriore contralaterale. Infatti, mentre in quest'ultimo erano presenti numerosi neuroni marcati dall'anticorpo anti-glutamato (Figura 9), nella regione mediale del complesso ventroposteriore (corrispondente, come detto sopra alla zona di rappresentazione della mano) erano presenti esclusivamente elementi cellulari che presentavano caratteristiche morfologiche del tutto differenti. Le cellule glutamato-positive presenti nella zona di rappresentazione della mano del complesso ventroposteriore dopo ablazione dell'analoga zona dell'area SI erano caratterizzate da dimensioni minori di quelle dei neuroni presenti nel talamo contralaterale e da un aspetto aracniforme (Figura 10). Sulla base di queste caratteristiche, queste cellule sono state considerate di natura astrogliale.*

*Distribuzione dei neuroni glutamato-positivi nell'area SII  
ipsilaterale alla sede della lesione ed analisi elettrofisiologica della  
stessa.*





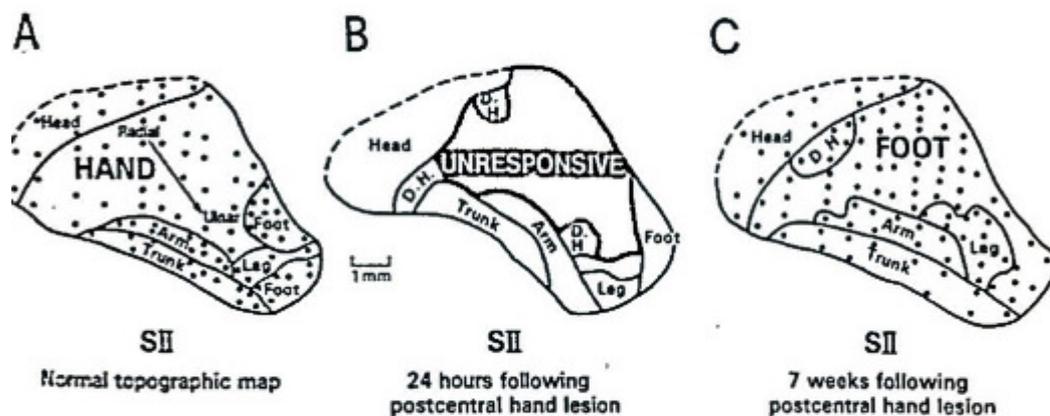
*Figura 10. Microfotografia di una porzione del complesso ventroposteriore (ipsilaterale alla sede dell'ablazione della zona di rappresentazione della mano dell'area SI) trattata per l'evidenziazione immunocitochimica di glutamato. Si noti che l'immunoreattività è ora concentrata in cellule di natura astrocitaria.*



*Figura 11. Microfotografia di una sezione coronale dell'area SII ipsilaterale all'area SI la cui zona di rappresentazione della mano è stata ablata circa 7 settimane prima del sacrificio. E' evidente che sia il numero che la distribuzione laminare dei neuroni glutamato-positivi non mostrano significative variazioni rispetto a quelli di animali normali.*

*La Figura 11 mostra una sezione coronale dell'area SII di una scimmia in cui 6-8 settimane prima era stata ablata la zona di rappresentazione della mano dell'area SI. E' evidente che numerosi neuroni glutamato-positivi sono presenti in tutti gli strati dell'area SII, che essi sono più numerosi negli strati II-III e V-VI e che questa distribuzione non mostra alcuna significativa differenza rispetto a quella precedentemente descritta nell'area SI contralaterale. Lo stesso risultato è stato confermato negli altri animali della stessa serie.*

*Com'è stato descritto in Materiali e Metodi, prima del sacrificio tutti gli animali venivano sottoposti ad analisi elettrofisiologica dell'area SII. Le sedute di registrazione si svolgevano dopo 6-8 settimane dalla lesione dell'area SI. Il risultato principale di questa parte dello studio consiste nella dimostrazione che, contrariamente a quanto si verifica nel caso della registrazione dopo 24 ore, 6-8 settimane dopo la lesione, l'area SII non è più silente. In particolare, nella zona di rappresentazione della mano di SII (ovvero quella porzione di SII nella quale in condizioni normali si registra l'attività dei neuroni in risposta alla stimolazione tattile della mano e che diventa silente 24 ore dopo l'ablazione di SI) si registravano, in accordo con i risultati precedentemente riportati da Pons e collaboratori (Pons et al., 1988), risposte alla stimolazione tattile dei recettori del piede (Figura 12). In altre parole, la regione di rappresentazione della mano, che era silente, è stata ora occupata dall'espansione della regione di rappresentazione del piede.*



*Figura 12. Schema riassuntivo dei risultati dell'analisi elettrofisiologica della zona di rappresentazione della mano dell'area SII in una scimmia normale (A), in una scimmia sottoposta 24 ore (B) o 7 settimane (C) prima all'ablazione dell'area di rappresentazione della mano dell'area SI ipsilaterale. Si noti che tutta l'area normalmente occupata dalla rappresentazione della mano contiene, dopo 7 settimane, l'espansione della zona di rappresentazione del piede (Basata in parte sui presenti risultati ed in parte sui risultati di Pons ed al., 1988).*

## DISCUSSIONE

*I risultati ottenuti nei presenti esperimenti dimostrano che: 1) dopo 6-8 settimane dall'ablazione della zona di rappresentazione della mano dell'area somestesica prima, non sono evidenziabili variazioni significative del numero e della distribuzione laminare dei neuroni glutamato-positivi nell'area somestesica seconda di scimmie adulte; 2) importanti variazioni si sono al contrario verificate nel complesso ventroposteriore del talamo; e 3) l'area somestesica seconda si è completamente riorganizzata e la regione nella quale era precedentemente rappresentata la mano è ora occupata dalla rappresentazione del piede.*

### Assenza di modificazioni dei livelli di glutamato nell'area SII in seguito a lesioni dell'area SI.

*L'assenza di modificazioni del numero e della distribuzione laminare dei neuroni glutamato-positivi nell'area SII in seguito all'ablazione di un'ampia porzione dell'area SI (quella corrispondente alla zona di rappresentazione della mano) può essere l'espressione di limiti della tecnica e/o della metodologia utilizzata. I fattori che potrebbero aver determinato un falso risultato negativo possono essere rappresentati: 1) dall'esecuzione di*

un'ablazione incompleta o; 2) di un'ablazione che interessava regioni topografiche diverse da quelle che si intendevano studiare; e 3) dall'inadeguatezza delle tecniche immunocitochimiche ad evidenziare sottili variazioni dei livelli intracitoplasmatici di Glu.

La prima possibilità, cioè l'esecuzione di un'ablazione incompleta, è da tenere in considerazione in quanto nel caso l'ablazione non avesse interessato l'intera estensione radiale della corteccia cerebrale ne conseguirebbe che parte delle proiezioni che dall'area SI vanno all'area SII sarebbero, con grossa probabilità, ancora parzialmente funzionanti e presumibilmente sufficienti ad attivare i neuroni dell'area SII e, conseguentemente, a mantenere normali i livelli di Glu. Questa possibilità è stata facilmente controllata nei preparati istologici ottenuti dalle tre scimmie della presente serie sperimentale ed in tutti i casi l'estensione radiale della lesione includeva totalmente i 6 strati che compongono la corteccia cerebrale ed era costante lungo l'estensione medio-laterale e rostro-caudale della stessa. Questo controllo permette perciò di escludere che il risultato negativo sia da attribuire all'esecuzione di lesioni incomplete.

La seconda possibilità, cioè l'esecuzione di lesioni topograficamente malposizionate, è più remota poichè la zona di rappresentazione della mano ha una notevole estensione nell'area SI e perchè la sua localizzazione topografica è costante. Nonostante ciò, questa possibilità è stata considerata in quanto è noto che la disposizione e la morfologia dei solchi, che sono stati

*utilizzati come riferimento per l'esecuzione delle lesioni, presentano variazioni a volte importanti. E' evidente, ad esempio, che se gli esperimenti fossero stati eseguiti in scimmie che possedevano un solco intraparietale o un solco arcuato verticale noi avremmo ablato, rispettivamente, una porzione del lobulo parietale inferiore o una porzione dell'area premotoria. Per queste ragioni, nelle tre scimmie è stata verificata dapprima macroscopicamente e poi istologicamente la localizzazione della lesione ed in tutti i casi essa era localizzata nell'area somestesica prima. Questa conclusione è suffragata dall'osservazione che, in sezioni del complesso ventroposteriore del talamo reagite per l'evidenziazione dell'enzima mitocondriale citocromo ossidasi o colorate secondo la tecnica di Nissl, è stato possibile mettere in evidenza la compromissione dell'integrità anatomica e funzionale dei neuroni della regione di rappresentazione della mano. Questi controlli permettono perciò di escludere che il risultato negativo sia da attribuire all'esecuzione di lesioni topograficamente malposizionate.*

*La terza possibilità, cioè la possibile inadeguatezza delle tecniche immunocitochimiche ad evidenziare sottili variazioni dei livelli intracitoplasmatici di Glu, è di fatto esclusivamente teorica, in quanto abbiamo precedentemente dimostrato che in un'analogha situazione sperimentale (taglio dei tre nervi dell'avambraccio) la stessa metodica e gli stessi reagenti permettono di evidenziare sottili variazioni dei livelli di Glu (Conti ed al., 1992). Questa possibilità sarebbe inoltre in contrasto con*

*l'osservazione che nello stesso preparato sperimentale sono presenti chiarissime variazioni dei livelli di Glu nel complesso ventroposteriore. Queste considerazioni permettono perciò di escludere che il risultato negativo sia da attribuire all'inadeguatezza della tecnica immunocitochimica ad evidenziare sottili variazioni dei livelli di Glu.*

*In conclusione, il fatto che l'ablazione dell'area SI di scimmie adulte non determini, dopo 6-8 settimane, alcuna variazione del numero e della distribuzione laminare dei neuroni Glu-positivi non è spiegabile sulla base delle considerazioni tecniche e metodologiche sopra esposte. Ne consegue che l'assenza di modificazioni del pattern di immunoreattività per il Glu ha significato funzionale.*

***Il significato funzionale dell'assenza di modificazioni dei livelli di glutamato nell'area SII in seguito a lesioni dell'area SI.***

*Una possibile interpretazione dei risultati ottenuti in questi esperimenti potrebbe consistere nell'ipotizzare che i livelli di Glu in un qualunque neurone glutamatergico siano funzione del grado di attività afferente e che solamente una riduzione cospicua del grado di attività sinaptica possa determinare una "down regulation" dei livelli di Glu. In altre parole, se un neurone glutamatergico riceve 100 afferenze eccitatorie è necessario che 50 siano silenti perchè vengano prodotti quei segnali intracellulari che portano*

*alla riduzione della sintesi degli enzimi necessari alla produzione di Glu. Questa ipotesi è difficilmente verificabile sperimentalmente, ma sembra non essere sostenibile in quanto è noto che l'ablazione dell'area SI provoca dopo 24 ore l'inattivazione funzionale dei neuroni dell'area SII, che, conseguentemente, smettono di rispondere alla stimolazione dei recettori tattili che sono normalmente capaci di eccitarli (Pons et al., 1987). Questi risultati indicano, cioè, che la proiezione SI-SII è critica nel determinare lo stato di attivazione funzionale dei neuroni di SII.*

*Quanto discusso sopra implica che l'interpretazione dei presenti risultati non può essere tentata sulla base dei soli risultati anatomici, ma deve tenere in considerazione i risultati dell'analisi elettrofisiologica effettuata negli stessi animali. Com'è stato descritto in Risultati, lo studio elettrofisiologico ha dimostrato che la regione dell'area SII nella quale prima dell'ablazione dell'area SI si registravano risposte alla stimolazione tattile della mano, rispondeva ora alla stimolazione tattile dei recettori del piede. In altre parole, l'area SII di scimmie con ablazione della regione di rappresentazione della mano dell'area SI dopo 6-8 settimane si era riorganizzata. L'avvenuta riorganizzazione implica una "normale" attività sinaptica e, di conseguenza, la presenza di livelli "normali" di segnali intracellulari critici per la produzione degli enzimi biosintetici per il Glu. L'osservazione che la presenza di "riorganizzazione" corticale non sia associata a variazioni dei livelli di Glu non è sorprendente, in quanto, com'è stato riportato in Introduzione, risultati*

simili sono stati ottenuti nell'area SII in seguito a lesioni dei tre nervi dell'avambraccio (Conti et al., 1992). In particolare, dopo 6-8 settimane dalla sezione dei nervi erano evidenziabili larghe isole prive di neuroni Glu-positivi nella zona della rappresentazione della mano dell'area SII. Nell'area SI, al contrario, il numero e la distribuzione laminare dei neuroni Glu-positivi erano del tutto simili a quelli di animali normali. L'analisi elettrofisiologica delle aree SI ed SII degli animali di quella serie sperimentale indicò che l'area SI era riorganizzata e che l'area SII era ancora silente.

I risultati degli esperimenti riportati in questa sede, perciò, concordano con quelli riportati in precedenza e rafforzano l'ipotesi che i livelli di Glu siano correlati con la presenza di riorganizzazione. Quando la corteccia si è riorganizzata, l'attività dei neuroni glutamatergici è normale, indipendentemente dal fatto che in quella regione di corteccia vi sia la rappresentazione della mano o del piede, mentre quando la corteccia non è ancora riorganizzata i neuroni glutamatergici non sono attivi e, pertanto, non risultano positivi alla marcatura immunocitochimica. Se questa ipotesi è vera, come suggeriscono i presenti risultati e quelli precedenti (Conti et al., 1992), ne consegue che la presenza di una normale marcatura immunocitochimica dei neuroni glutamatergici corticali dipende dal periodo di tempo che intercorre tra la lesione ed il sacrificio (tempo di sopravvivenza). La nostra ipotesi è che riducendo drasticamente il tempo di sopravvivenza dopo

*l'ablazione dell'area SI scomparirebbero i neuroni glutamatergici nell'area SII. Questa ipotesi è confermata da un'osservazione preliminare effettuata in una scimmia nella quale, 3 giorni dopo il taglio dei nervi periferici, la regione di SII priva di neuroni glutamato-positivi era di gran lunga superiore a quella osservata nelle scimmie con 6-8 settimane di sopravvivenza. La definitiva conferma di quest'ipotesi verrà quando scimmie con ablazione della regione di rappresentazione della mano verranno sacrificate dopo pochi giorni.*

***Il significato funzionale delle modificazioni dei livelli di glutamato nel complesso ventroposteriore del talamo in seguito all'ablazione dell'area SI.***

*Come ricordato in precedenza, si sono osservate importanti variazioni nella marcatura immunocitochimica per il glutamato nel complesso ventroposteriore del talamo. Il complesso ventroposteriore riceve le afferenze somestetiche dai nuclei delle colonne dorsali e dal fascio spinotalamico e proietta all'area somestetica prima (Kaas e Pons, 1988). Nel talamo normale numerosi neuroni sono glutamato-positivi, mentre nei preparati di questa serie sperimentale, le cellule glutamato-positive non esibiscono le caratteristiche dei neuroni. Al contrario, esse mostrano le caratteristiche delle cellule gliali, ed in particolare degli astrociti (Peters ed al., 1991). In*

altre parole, le modificazioni osservate nel talamo non consistono tanto in una riduzione o in un aumento del numero dei neuroni, ma in una completa redistribuzione del glutamato intracellulare, che dal pool neuronale passa al pool gliale. Questa redistribuzione si spiega con il fatto che, nelle nostre condizioni sperimentali (ablazione di SI) i neuroni del complesso ventroposteriore degenerano, muoiono e vengono successivamente fagocitati, com'è dimostrato dalle Figure 6 e 7. In conseguenza della morte cellulare e della lisi delle membrane cellulari, il glutamato fuoriesce dai neuroni glutamatergici e viene captato dalle cellule gliali che, contrariamente a quanto si riteneva fino a pochi anni fa, possiedono meccanismi di captazione per numerosi neurotrasmettitori (Barres, 1991; Bevan, 1990; Blankenfeld e Kettenmann, 1992).

**Glutamato e riorganizzazione della corteccia cerebrale:  
epifenomeno o rapporto causale?**

I risultati ottenuti in questi esperimenti ed in quelli precedenti (Conti et al., 1992) indicano l'esistenza di una correlazione tra i livelli corticali di glutamato e la riorganizzazione plastica della corteccia cerebrale. Riteniamo che questi risultati possano, conservativamente, essere interpretati alla luce dei noti fenomeni di variazioni dipendenti dall'attività dei livelli corticali dei vari trasmettitori sinaptici (cfr. Introduzione). E' tuttavia possibile ipotizzare

*che le variazioni non siano solamente un epifenomeno della riduzione dell'attività afferente, ma che esse siano l'evento scatenante una serie di variazioni cellulari e molecolari che si trasformano, in ultima analisi, nella produzione di segnali capaci di attivare meccanismi riparatori o rigenerativi presenti, ma silenti, in tutti i neuroni. Per poter verificare questa ipotesi è necessario conoscere quale sottotipo di recettori per il glutamato media gli effetti della riduzione dell'attività afferente.*

*E' noto che l'azione del glutamato è mediata da diversi tipi di recettori (Mayer e Westbrook, 1987; Collingridge e Lester, 1989) che vengono suddivisi in recettori ionotropi (che determinano, cioè, flusso di ioni attraverso la membrana plasmatica) e recettori metabotropi (che attivano esclusivamente eventi molecolari intracellulari, ma che non si accompagnano a flussi ionici e, pertanto, non determinano variazioni rapide del potenziale di membrana). La grossa famiglia dei recettori ionotropi del glutamato è, a sua volta, suddivisa in 3 gruppi: recettori AMPA, recettori per l'acido kainico (KA) e recettori per il N-metil-D-aspartato (NMDA). Quest'ultimo gruppo di recettori sembra rappresentare un tipo di recettore assolutamente peculiare nel panorama dei recettori presenti nel sistema nervoso centrale (Watkins e Collingridge, 1989). Il recettore NMDA possiede, infatti, una serie di proprietà uniche, come la magnesio-dipendenza, la voltaggio-dipendenza, l'elevato numero di siti di legame per altre molecole (glicina, spermina, ecc..). Ma l'aspetto più interessante di questo tipo di recettore è che*

numerose evidenze sperimentali ottenute nel corso degli ultimi anni, hanno dimostrato che esso è coinvolto in numerosi fenomeni di "plasticità" sinaptica a livello della corteccia cerebrale (Artola e Singer, 1989). E' stato così dimostrato che il recettore NMDA media fenomeni come la long term potentiation, una forma di modificazione sinaptica che viene generalmente considerata un utile modello dei processi di apprendimento e di memoria, nel cervello dell'adulto e che, nel neonato, esso media fenomeni come la definizione del bersaglio di un assone, la stabilizzazione della morfologia dei neuroni e la modulazione dell'estensione dell'arborizzazione assonica (Debski et al., 1990). Queste evidenze suggeriscono, pertanto, che il recettore NMDA sia responsabile di numerosi fenomeni di plasticità osservabili nel sistema nervoso centrale.

Lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare ha permesso la definizione della struttura di questi recettori e, di conseguenza, la produzione di probes capaci di visualizzare con grande selettività e specificità la distribuzione degli RNA messaggeri o delle stesse proteine. Abbiamo perciò iniziato uno studio sistematico della distribuzione dei vari sottotipi di recettori per il glutamato nella corteccia cerebrale (Conti et Minelli, 1992 a e b; Conti ed al., 1993). Una volta definito il pattern normale di distribuzione dei vari recettori si procederà allo studio degli effetti della sezione dei nervi e della lesione di un'area cerebrale.

## BIBLIOGRAFIA

Artola, A., e W. Singer (1987) Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature*, 330: 649-652.

Artola, A., e W. Singer (1989) NMDA receptors and developmental plasticity in visual neocortex. In: J.C. Watkins, e G.L. Collingrife (eds) *The NMDA Receptor*, pp. 153-166. IRL Press, Oxford.

Artola, A., e W. Singer (1990) The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 2: 254-269.

Baker, H.T., T. Kawano, F.L. Margolis, e T.H. Joh (1983) Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J. Neurosci.*, 3: 69-78.

Barres, B.A. (1991) New roles for glia. *J. Neurosci.*, 11: 3685-3694.

Bevan, S. (1991) Ion channels and neurotransmitter receptors in glia. *Sem. Neurosci.*, 2: 467-481.

*Black, I.B., J.E. Adler, C.F. Dreyfus, G.M. Janakait, D.M. Katz, E.F. LaGamma, e K.M. Markey (1984) Neurotrasmitter plasticity at the molecular level. Science, 225: 1266-1270.*

*Blankenfeld, G., Kettenmann, H. (1992) Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cells. Mol. Neurobiol., 5: 31-43.*

*Bliss, T.V.P., e G.L. Collingridge (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature, 361: 31-39.*

*Collingridge, G.L., e R.A.J. Lester (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol. Rev., 40: 143-210.*

*Conti, F. (1991) Toward the anatomical identification of glutamatergic neurons and synapses in the cerebral cortex. In: B.S. Meldrum et al. (eds) Excitatory Amino Acids, pp. 45-53. Raven Press, New York.*

*Conti, F., A. Rustioni, P. Petrusz, e A.C. Towle (1987) Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. J. Neurosci., 7: 1887-1901.*

Conti, F., M. Fabri, e T. Manzoni (1988a) Glutamate-positive corticocortical neurons in the somatic sensory areas I and II of cats. *J. Neurosci.*, 8: 2948-2960.

Conti, F., P. Barbaresi, e M. Fabri (1988b) Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience*, 24: 629-633.

Conti, F., M. Fabri, e T. Manzoni (1988c) Immunocytochemical evidence for glutamatergic cortico-cortical neurons in monkeys. *Brain Res.*, 462: 148-153.

Conti, F., J. DeFelipe, I. Farinas, e T. Manzoni (1989) Glutamate-positive neurons and axon terminals in cat sensory cortex: A correlative light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 290: 141-153.

Conti, F., e A. Minelli (1992a) Distribution and morphology of neurons expressing the GluR 2/3 subunit in four neocortical areas of monkeys. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 18: 1149.

Conti, F., e Minelli, A. (1992b) Subunit-specific antibodies reveal the distribution and morphology of neurons expressing AMPA-selective

glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the cerebral cortex of rats and monkeys. *Neurosci. Lett., Suppl.*43, 29.

Conti, F., T.P. Pons, e A. Minelli (1992) Activity-dependent changes of glutamate-immunoreactivity in the somatic sensory cortex of monkeys following peripheral and central manipulations of somatosensory input. In: *Excitatory Amino Acid 1992* (P., Krogsgaard-Larsen e K.G. Reymann, eds.) p. 10 (Abstr.).

Conti, F., Minelli, A., Molnar, M., e N.C. Brecha (1993) Cellular localization and laminar distribution of NMDAR1 mRNA in the rat cerebral cortex. *J. Neurosci.*, spedito per la pubblicazione.

Debski, E.A., H.T. Cline, e M. Costantine-Paton (1990) Activity-dependent tuning and the NMDA receptor. *J. Neurobiol.*, 21: 18-32.

Fonnum, F. (1984) Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 42: 1-11.

Garraghty, P.E., e M. Sur (1990) Morphology of single intracellularly stained axons terminating in area 3b of macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.*, 294: 583-593.

Garraghty, P.E., e J.H. Kaas (1991) *Large-scale functional reorganization in adult monkey cortex after peripheral nerve injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 6976-6980.*

Hendry, S.H.C., e E.G. Jones (1986) *Reduction in number of immunostained GABAergic neurons in deprived-eye dominance columns of monkey area 17. Nature, 320: 750-753.*

Hendry, S.H.C., E.G. Jones, e N. Burstein (1988) *Activity-dependent regulation of tachykinin-like immunoreactivity in neurons of monkey visual cortex. J. Neurosci., 8: 1225-1238.*

Hendry, S.H.C., e E.G. Jones (1988) *Activity-dependent regulation of GABA expression in the visual cortex of adult monkey. Neuron, 1: 701-712.*

Hsu, S.M., L. Raine, e H. Fanger (1981) *Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29: 557-580.*

Jones, E.G., Hendry, S.H.C., e D.P. Friedman (1982) *Thalamic basis of place- and modality-specific columns in monkey somatosensory cortex: A*