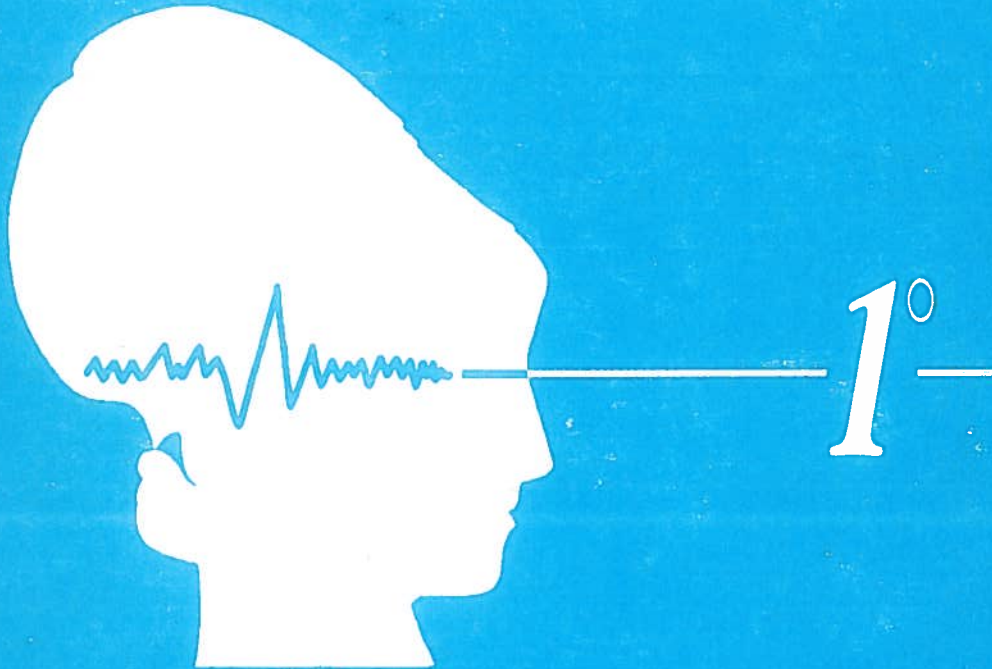


INCONTRI – DIBATTITO DI OFTALMOLOGIA



NEUROFISIOLOGIA DELLA VISIONE:  
DALLA SPERIMENTAZIONE ALLA CLINICA

FONDAZIONE  
PER L'OFTALMOLOGIA  
G.B. BIETTI



CLINICA OCULISTICA  
DELL'UNIVERSITÀ  
DI ROMA  
TOR VERGATA



*Roma, 20 Giugno 1992*



## PLASTICITA' DEL SISTEMA VISIVO: IL RUOLO DEI FATTORI NEUROTROFICI.

L. Domenici, N. Berardi, V. Parisi, T. Pizzorusso, M. Fagiolini, A. Cellerino e L. Maffei.

Istituto di Neurofisiologia del CNR, Pisa, e Scuola Normale Superiore, Pisa.

### Introduzione

Per plasticità neurale intendiamo la capacità del sistema nervoso centrale di modificarsi in seguito a stimoli ambientali. Per alcune funzioni del sistema nervoso, come l'apprendimento e la memoria, l'influenza dell'ambiente si protrae per tutta la vita mentre altre funzioni sono modificabili solo in un determinato periodo dello sviluppo: il periodo critico. Il sistema visivo fornisce numerosi esempi per la comprensione dei fenomeni di plasticità del sistema nervoso.

A livello della corteccia visiva esistono neuroni in grado di rispondere, ovvero di modificare la loro frequenza di scarica in risposta a stimoli visivi presentati ad entrambi gli occhi. Essi tendono a essere raggruppati in funzione della loro capacità di rispondere a stimoli visivi presentati all'uno, all'altro occhio o ad entrambi. Questo crea, all'interno della corteccia visiva, delle zone alternate di dominanza dell'uno o dell'altro occhio, che nel gatto e nel primate assumono l'aspetto morfologico di colonne: queste zone sono chiamate colonne di dominanza oculare (Hubel et al. 1977).

La formazione delle colonne durante lo sviluppo è tardiva. Prima dell'apertura degli occhi (ratto 14 giorni postnatali (P), gatto P14, scimmia P0) lo strato IV è innervato diffusamente da fibre provenienti da entrambi gli occhi. In seguito avviene una segregazione delle fibre che porta ad una organizzazione dei neuroni binoculari in colonne di dominanza oculare e ad una diminuzione del numero delle cellule binoculari (LeVay et al., 1978, 1980; Kalil, 1990). Questo fenomeno risulta essere in qualche modo regolato dall'attività elettrica. Gatti allevati al buio o nei quali veniva bloccata la scarica afferente lungo i nervi ottici (mediante iniezione intraoculare di TTX, un bloccante dei canali sodio voltaggio-dipendenti) non mostrano a livello della corteccia visiva l'organizzazione in colonne di dominanza oculare (Stryker e Harris, 1986).

La formazione delle colonne di dominanza oculare sembra inoltre coinvolgere processi competitivi tra i due

occhi. Hubel e Wiesel (1963) infatti, hanno dimostrato che se un occhio e' deprivato mediante sutura delle palpebre durante il periodo critico il suo ingresso funzionale alla corteccia visiva e' drammaticamente ridotto: solo poche cellule sono guidate dall'occhio deprivato. Morfologicamente l'estensione delle colonne di dominanza oculare innervate dalle fibre del genicolato che portano l'informazione dell'occhio deprivato e' fortemente ridotta, mentre le colonne innervate dalle fibre non deprivate si allargano (Levay et al., 1980). Esiste un deficit anche a livello del genicolato: il diametro dei neuroni che ricevono l'ingresso dalla retina deprivata risultano ridotto (20% - 40% a seconda delle specie studiata (Guillery and Stelzner, 1970). Occorre pero' sottolineare che questa riduzione avviene solo a carico di quei neuroni che inviano le fibre alla zona binoculare della corteccia visiva primaria. Questo suggerisce che il fenomeno sia causato dalla competizione tra i due occhi a livello corticale.

Gli effetti della deprivazione monoculare sono stati considerati paradigmatici per lo studio di quelle patologie che, nell'uomo, inducono uno sbilanciamento della visione tra i due occhi nei primi anni di vita. In questi casi si sviluppa un grosso deficit in acuita' visiva da parte di uno dei due occhi (ambliopia). Questo fenomeno avviene anche nei modelli animali (gatto e scimmia) della deprivazione monoculare; vari autori hanno infatti dimostrato con metodiche comportamentali ed elettrofisiologiche (Potenziali Evocati Visivi) che la deprivazione provoca una sensibile perdita in acuita' visiva e sensibilita' al contrasto da parte dell'occhio deprivato (Giffin and Mitchell, 1978).

Un'altra patologia capace di indurre deficit percettivi nell'uomo e' lo strabismo. Anche altri mammiferi (gatto e scimmia) resi chirurgicamente strabici durante il periodo critico possono sviluppare ambliopia. Registrazioni elettrofisiologiche da singole cellule hanno, inoltre, evidenziato una grossa perdita di neuroni binoculari corticali.

I meccanismi che sono alla base delle alterazioni causate dallo strabismo non sono ancora chiari. Fin dai primi esperimenti di Hubel and Wiesel (1965) un punto chiave e' stato individuato nello sbilanciamento dell'attivita' elettrica nei due nervi ottici e quindi nei neuroni del genicolato che proiettano in corteccia. Nello strabismo, in punti corrispondenti nelle due retine si formerebbe l'immagine di parti differenti del campo visivo, da cui risulterebbe un differente tipo di scarica nei due nervi ottici. E' stato, in effetti, riportato che la stimolazione sincrona dei due nervi ottici durante il periodo critico preserva un maggior numero di cellule binoculari (Stryker e Strickland, 1984).

Recentemente sono emersi dati che suggeriscono come fattori neurotrofici della famiglia del Nerve Growth Factor

(NGF) possano essere coinvolti nella plasticità a livello del SNC. In particolare, si è mostrato che l'attività elettrica nervosa può influenzare la produzione di BDNF (brain derived neurotrophic factor) e NGF (vedi Levi-Montalcini 1987), a livello dell'ippocampo (Zafra et al., 1991). Inoltre, relativamente alla corteccia visiva dei mammiferi, è noto che il NGF viene ivi prodotto, con un picco durante il periodo critico ed una successiva caduta che porta a raggiungere i livelli dell'adulto alla fine del periodo critico (Large et al., 1986; Hayashy et al., 1989). Si è quindi cercato di verificare se i deficit indotti dallo strabismo o della deprivazione monoculare potessero derivare da un ridotto apporto neuronale di fattore neurotrofico. Con l'intento di aumentare i livelli interni di NGF si è proceduto a somministrare NGF intraventricolarmente a ratti resi chirurgicamente strabici e a ratti monocularmente deprivati (Berardi et al., 1991; Domenici et al. 1991; Maffei et al., 1991).

## MATERIALI E METODI

### 1) Deprivazione monoculare

Tredici ratti sono stati monocularmente deprivati (MD) per mezzo della sutura delle palpebre al quindicesimo giorno di vita postnatale (giorno di apertura degli occhi nel ratto) per circa un mese. Questo periodo è stato scelto in base a lavori precedentemente svolti (Rothblat et al. '78; Rothblat e Schwartz '79).

Cinque ratti deprivati monocularmente sono stati trattati con iniezioni intraventricolari di una soluzione contenente B-NGF (lug/ul); 2 ratti (ratti di controllo) sono stati trattati con una soluzione contenente Citocromo C, molecola con stesso punto isoelettrico dell'NGF che viene normalmente utilizzata come sostanza di controllo.

### 2) Lo strabismo chirurgicamente indotto

12 ratti sono stati resi chirurgicamente strabici, mediante tenotomia del muscolo retto laterale nel punto di inserzione sclerale a 2 mm dal limbus. Tale intervento produceva uno strabismo convergente (Esoforia) di circa 12 diottrie prismatiche. L'intervento veniva effettuato immediatamente dopo l'apertura degli occhi.

Dei 12 ratti resi strabici, 5 non sono stati trattati, 5 sono stati trattati con NGF, e 2 (ratti di controllo) sono stati trattati con Citocromo C.



### 3) Il trattamento con NGF o Citocromo C

Il trattamento con NGF o con citocromo C e' iniziato a P14 ed e' continuato a giorni alterni per un mese (P45).

Il B-NGF ( Fidia Research Laboratories, Abano Terme) era preparato in soluzione salina ad una concentrazione di 1-1.6 ug/u; il volume iniettato era di di 2 ul, a giorni alterni. Il citocromo C era preparato alla stessa concentrazione del NGF.

Le iniezioni di B-NGF e di citocromo C venivano effettuate intraventricolarmente, tramite una microsiringa connessa ad una cannula (calibro 27) inserita 1 mm lateralmente alla linea mediana ed 1 mm posteriormente al bregma.

Durante l'intervento chirurgico, e durante le iniezioni di NGF o citocromo C, l'animale era posto in stato di anestesia generale con etere.

### 4) Registrazione dei singoli neuroni di corteccia visiva

Al termine del periodo critico (P45) abbiamo valutato l'effetto della deprivazione monoculare e dello strabismo e del relativo trattamento con NGF o citocromo C mediante registrazioni extracellulari da singoli neuroni della corteccia visiva primaria (per i protocolli seguiti vedi Berardi et al., 1991; Domenici et al. 1991; Maffei et al., 1991).

Per ciascuna cellula veniva valutata la classe di dominanza oculare: infatti le cellule della corteccia binoculare possono rispondere esclusivamente a stimoli visivi presentati dall'occhio controlaterale (classe 1), prevalentemente alla stimolazione dell'occhio controlaterale (classi 2-3), in modo uguale alla stimolazione di entrambi gli occhi (classe 4), prevalentemente alla stimolazione dell'occhio ipsilaterale (classe 5-6) o a stimoli presentati esclusivamente all'occhio ipsilaterale (classe 7). Erano considerate cellule "non classificabili" quelle che non rispondevano allo stimolo visivo.

## RISULTATI

Abbiamo preso in esame i risultati ottenuti dalle registrazioni di singole cellule della corteccia visiva su: ratti normali, ratti deprivati e ratti strabici.

### Ratti normali

Nel ratto normale (Fig. 1A) e' presente una

distribuzione in classi di dominanza oculare che riflette la prevalenza delle fibre crociate rispetto a quelle dirette (Polyak, 1957): infatti i neuroni corticali dominati dall'occhio controlaterale sono il 65.8%, mentre quelli dominati dall'occhio ipsilaterale sono solo il 10.6%. E' da rilevare che il 76.6% delle cellule risponde a stimoli provenienti da entrambi gli occhi, in accordo con quanto già dimostrato da precedenti studi.

#### Ratti con deprivazione monoculare

Nel ratto deprivato durante il periodo critico (Fig. 1B) si osserva, rispetto al normale, una significativa riduzione dei neuroni binoculari e dei neuroni guidati dall'occhio deprivato. La distribuzione di dominanza oculare subisce uno spostamento verso l'occhio rimasto aperto.

Il trattamento con NGF durante il periodo critico (Fig. 1C), previene la perdita dei neuroni binoculari e mantiene normale la distribuzione di dominanza oculare..

Nel ratto deprivato e trattato durante il periodo critico con citocromo C (Fig. 1D) si osserva una distribuzione in classi di dominanza oculare sovrapponibile a quella del ratto deprivato non trattato.

#### Ratti strabici

Nella figura 2 sono riportate le distribuzioni in classi di dominanza oculare dei neuroni registrati nella corteccia visiva primaria dei ratti strabici, dei ratti strabici trattati con NGF e dei ratti strabici trattati con citocromo C.

Nel ratto reso strabico durante il periodo critico (Fig. 2B) si osserva, rispetto al normale (Fig. 2A), una significativa riduzione dei neuroni binoculari. Si ha inoltre un aumento delle cellule di classe 1, 5-6 e 7 ed una riduzione di quelle di classe 2-3.

Il trattamento con NGF (Fig. 2C) previene completamente la perdita dei neuroni binoculari. Inoltre, la distribuzione di dominanza oculare non differisce da quella ottenuta nei ratti normali.

Nel ratto reso strabico e trattato con citocromo C (Fig. 2D) si osserva una distribuzione in classi di dominanza oculare sovrapponibile a quella del ratto strabico non trattato.

La selettività delle cellule corticali visive per l'orientamento degli stimoli visivi, non è modificata dalla presenza di strabismo o dal trattamento con NGF. Infatti le cellule non orientazionali registrate nei ratti strabici ed in quelli strabici trattati con NGF non aumentano significati-

vamente rispetto a quelle del ratto normale (non riportato in figura).

## CONCLUSIONI

La deprivazione monoculare e lo strabismo effettuati durante il periodo critico, costituiscono due modelli sperimentali per studiare i fenomeni plastici che caratterizzano la corteccia visiva dei mammiferi. Anche nel ratto pigmentato queste due manipolazioni provocano cambiamenti funzionali che possono risultare irreversibili. In questo studio abbiamo mostrato come un trattamento prolungato con NCF sia in grado di prevenire gli effetti della deprivazione monoculare e dello strabismo. Sulla base di questi dati e sul fatto che il NGF e' fisiologicamente presente al livello della corteccia visiva e modulato (nella sua produzione) durante il periodo critico (Large et al. 1986; Hayashy et al., 1989) abbiamo formulato la seguente ipotesi: le fibre del genicolato sarebbero in competizione per un fattore neurotrofico, il NGF, prodotto dai neuroni corticali. La produzione e/o la captazione sarebbero dipendenti dall'attivita' elettrica delle fibre del genicolato. Secondo questo modello, nella deprivazione monoculare, l'attivita' elettrica delle fibre del genicolato guidate dall'occhio deprivato sarebbe ridotta, causando a sua volta una diminuzione dei livelli di NGF. I neuroni deprivati del genicolato non sarebbero piu' in grado di prendere il poco NGF rimasto ed andrebbero incontro a riduzione di numero e di volume (fenomeno dello "shrinkage" delle colonne di dominanza oculare e dello "shrinkage" dei corpi cellulari dei neuroni del genicolato innervati dall'occhio deprivato).

Nello strabismo l'asincronia delle scariche elettriche dei neuroni del genicolato guidati dai due occhi provocherebbe una diminuzione nella produzione di NGF da parte del neurone binoculare corticale. Il NGF non sarebbe piu' sufficiente per tutte le cellule ed i neuroni del genicolato che presentano un'attivita' elettrica piu' povera verrebbero penalizzati e perderebbero le loro connessioni corticali.

Tuttavia lo stato attuale della ricerca sulla interazione tra fattori neurotrofici e plasticita' visiva corticale lascia diversi punti che dovranno essere approfonditi da ulteriori studi. Infatti non è ancora ben definita la localizzazione delle cellule corticali in grado di sintetizzare e rilasciare NGF e la distribuzione delle fibre che presentano il recettore per il NGF. Resta, inoltre da chiarire l'esatto ruolo dei fattori neurotrofici nei meccanismi che presiedono alla stabilizzazione delle sinapsi corticali.

Ci sembra pero' importante sottolineare che e'



possibile modulare mediante somministrazione esogena di NGF i fenomeni di formazione e stabilizzazione delle sinapsi durante il periodo critico.

Questi risultati, oltre ad aprire nuove prospettive nella comprensione dei fenomeni presenti durante lo sviluppo del sistema visivo, potrebbero avere implicazioni terapeutiche nella prevenzione degli effetti ambliopici che molteplici patologie oculari sono in grado di produrre.

Ringraziamenti: Si ringraziano il Sig. G. Cappagli per l'assistenza tecnica; i Dr. D. Burr e C. Morrone per aver elaborato il software per l'acquisizione dei segnali bioelettrici; la Fidia s.p.a. per aver donato il NGF.

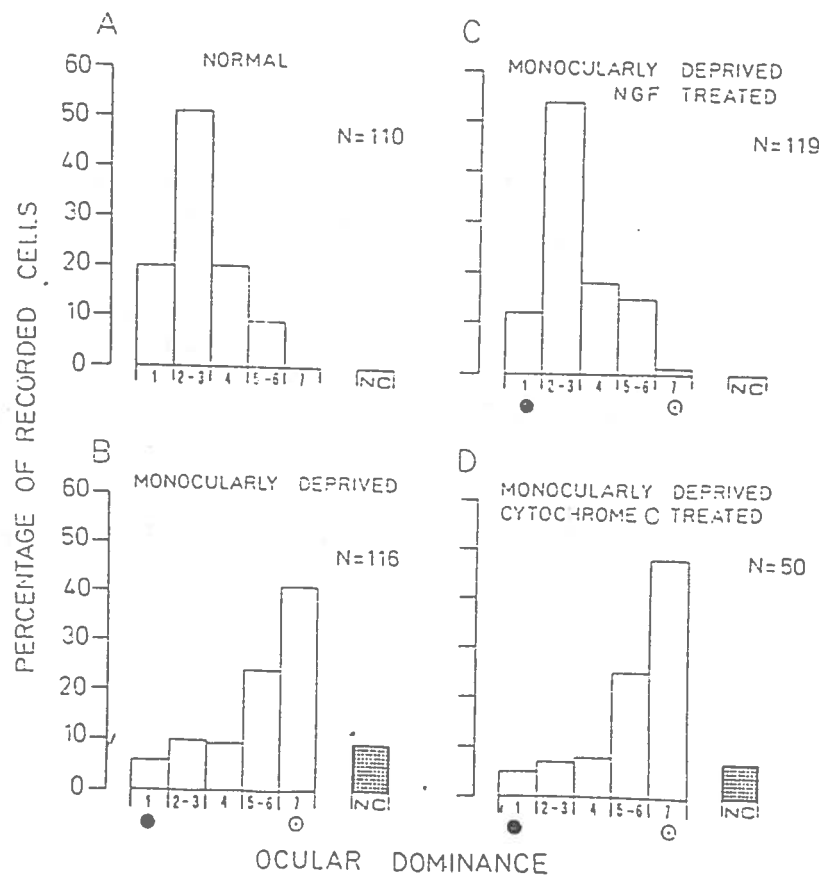


Fig.1. Distribuzione della dominanza oculare sulla base di registrazioni di singoli neuroni della corteccia visiva primaria in ratti normali (A), ratti con deprivazione monoculare (B), ratti con deprivazione monoculare e iniezioni intraventricolari di NGF (C) e ratti di controllo deprivati e trattati con citocromo C (D). Le registrazioni sono state effettuate nell'emisfero controlaterale all'occhio deprivato. I neuroni di classe di dominanza oculare 1 rispondono esclusivamente a stimolazioni dell'occhio controlaterale; i neuroni di classe 2-3 sono binoculari e rispondono preferenzialmente all'occhio controlaterale; i neuroni di classe 4 rispondono in maniera uguale a stimoli dei due occhi; i neuroni di classe 5-6 sono binoculari e rispondono prevalentemente all'occhio ipsilaterale; i neuroni di classe 7 rispondono esclusivamente all'occhio ipsilaterale. Sono state considerate non classificabili (nc) quelle cellule che non rispondevano allo stimolo visivo.

Nel ratto deprivato si osserva una diminuzione delle cellule di classe 1, 2-3 e 4 ed un aumento delle cellule di classe 5-6 e 7. Nel ratto deprivato e trattato con NGF si osserva una distribuzione in classi di dominanza oculare normale.

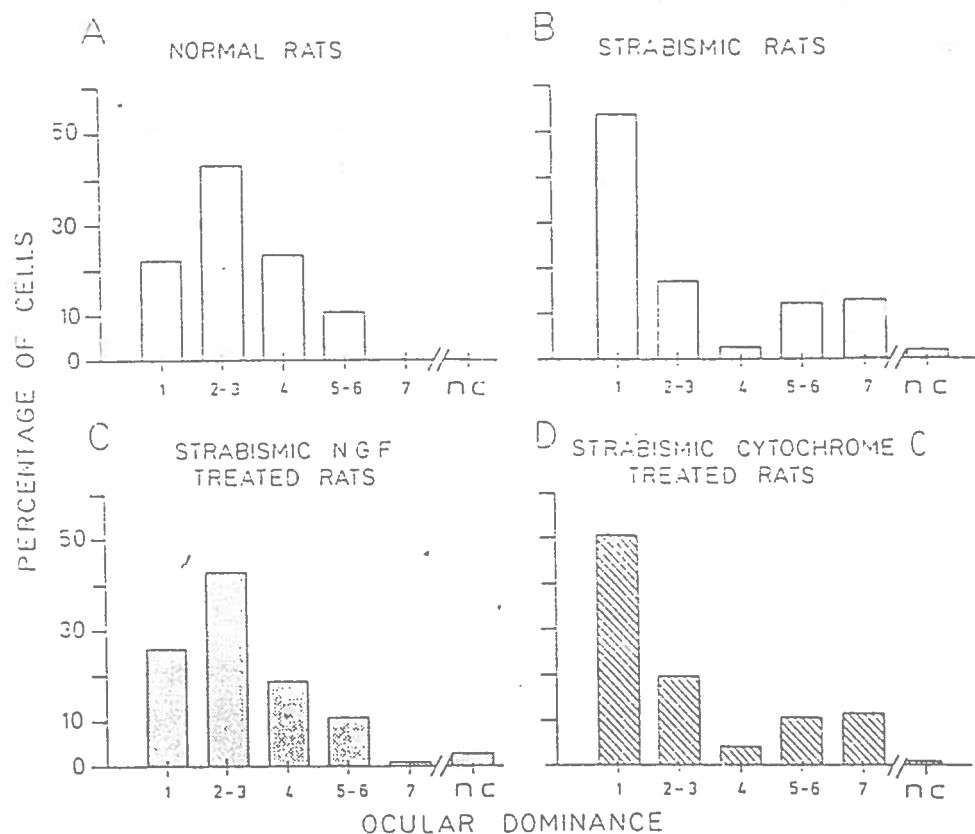


Fig. 2. Distribuzione in classi di dominanza oculare dei neuroni della corteccia visiva del ratto normale (A), del ratto strabico (B), del ratto strabico trattato con NGF (C) e del ratto strabico trattato con citocromo C (D). Le singole cellule sono state registrate nella corteccia controlaterale all'occhio strabico (area visiva primaria, porzione binoculare). La classificazione in classi di dominanza oculare è la stessa utilizzata per i ratti deprivati. Nel ratto strabico ed in quello trattato con citocromo C si osserva, rispetto al ratto normale una riduzione delle cellule di classe 4 (neuroni binoculari) ed un aumento delle cellule di classe 1 e 7 (neuroni esclusivamente monoculari). Nel ratto strabico e trattato con NGF la distribuzione è uguale a quella del ratto normale.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Berardi N., Carmignoto G., Cremisi F., Domenici L., Maffei L., Parisi V., Pizzorusso T.: J.Physiol. (London) 434:14P; 1991.
- 2) Domenici L., Berardi N., Carmignoto G., Vantini G. and Maffei L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:8811-8815; 1991.
- 3) Domenici L., Berardi N., Carmignoto G., Pizzorusso T., Parisi V. and Maffei L. "Maturation and aging in the CNS" Plenum Press NY 222:80-90; 1991.
- 4) Domenici L., Cellerino A. and Maffei L. Soc. Neurosci. (Abs) 17, 451.22; 1991.
- 5) Giffin F., Mitchell E.D. J. Physiol. 274:511-537; 1978.
- 6) Guillery R.W., Stelzner D.J. J. Comp. Neurol. 139:413-422; 1970.
- 7) Hayashy M., Yamashita A. and Shimizu K. Neuroscience, 36; 683-689; 1989.
- 8) Hubel D.H. and Wiesel T.N. J. Neurophysiol. 26:994-1002; 1963.
- 9) Hubel D.H. and Wiesel T.N. J. Neurophysiol. 28:1041-1059; 1965.
- 10) Hubel D.H., Wiesel T.N. and LeVay S. Philos. Trans. R. Soc. Lond. , 278, 377-409; 1977.
- 11) Kalil R.E. Le Scienze 194:206-209; 1990.
- 12) Large T.H., Bodary S.C., Clegg D.O., Weskamp G., Otten U. and Reichardt L.F. Science 234:352-355; 1986.
- 13) LeVay S., Stryker M.P. and Shatz C.J. J. Comp. Neurol. 179:223-244; 1978.
- 14) LeVay S., Wiesel T.N. and Hubel D.H. J. Comp. Neurol. 191:1-51; 1980.
- 15) Levi-Montalcini R. Science 237:1154-1162; 1987.
- 16) Maffei L., Berardi N., Carmignoto G., Cellerino A., Domenici L., Fiorentini A. and Pizzorusso T. MIT Press Vol 8, in press; 1992.

- 17) Poliak P. "The vertebrate visual system" University Chicago Press; 1957.
- 18) Rothblat L.A., Schwartz M.L. and Kasdan P.M. Brain Res. 158:456-460; 1978.
- 19) Rothblat L.A. Schwartz M.L. Brain Res. 161:156-161; 1979.
- 20) Stryker M.P. and Strickland S.L. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 25S No. 3: 278; 1984.
- 21) Stryker M.P. and Harris W.A. J. Neurosci. 6, 2117-2133; 1986.
- 22) Zafra F., Castren E., Thoenen T., Lindholm D. Proc. Nat. Acad. Sci. 88, 10037-10041; 1991.

