

Retinite pigmentosa, movimenti oculari e ambliopia, glaucoma.
Atti VI° Corso sulle tecniche elettrofisiologiche in Oftalmologia.
Ed.: M.Cordella, G.Baratta, C.Macaluso. Casa Ed. Mattioli, Fidenza 1991.

Plasticità visiva corticale ed interazione con fattori neurotrofici: modelli sperimentali di ambliopia

*Luciano Domenici, Vincenzo Parisi, Nicoletta Berardi,
Tommaso Pizzorusso, Lamberto Maffei.*

Istituto di Neurofisiologia del CNR, Pisa, Italia.

Sommario

- 1) Introduzione
 - A) Sviluppo delle aree corticali visive: effetti da deprivazione monoculare
 - B) Modelli animali per lo studio dei fenomeni indotti dalla deprivazione monoculare
 - C) Deprivazione monoculare e potenziamento sinaptico
 - D) Deprivazione monoculare e modificazioni anatomiche
 - E) Per una teoria neurotrofica della plasticità visiva corticale
- 2) Il NGF previene gli effetti ambliopici della deprivazione monoculare.
 - A) Materiale e metodi
 - B) Risultati
 - C) Conclusioni
- 3) Bibliografia

Introduzione

Per plasticità neuronale si intende la capacità delle strutture nervose di modificarsi in seguito a stimoli ambientali. Per alcune funzioni, come l'apprendimento e la memoria, l'influenza dell'ambiente si protrae per tutta la vita mentre per altre la plasticità è presente solo in un determinato periodo dello sviluppo del sistema nervoso: il periodo critico. I sistemi sensoriali forniscono numerosi esempi per la comprensione dei fenomeni di plasticità del sistema nervoso.

I neuroni dei centri superiori delle vie auditive rispondono solo a determinati intervalli di frequenza dello stimolo acustico. Se si pone un animale durante lo sviluppo in ambiente acusticamente povero gli intervalli di frequenze acustiche percepite risultano permanentemente ed irreversibilmente alterati.

Nel sistema somatosensoriale il taglio delle vibrisse (baffi facciali) di rattini, senza lesioni nervose, induce una variazione permanente ed irreversibile della risposta elettrofisiologica dei neuroni corticali somatotopicamente corrispondenti alle vibrisse tagliate.

Anche il sistema visivo viene influenzato dall'ambiente e la buona conoscenza che si ha delle sue proprietà ne fa un candidato ideale per lo studio della plasticità.

È noto che a livello della corteccia visiva esistono neuroni in grado di rispondere a stimoli visivi provenienti da entrambi gli occhi. In numerosissime specie, infatti, i campi visivi monoculari si sovrappongono (60° nel ratto, 90° nel gatto, circa 120° nell'uomo). Le cellule gangliari della retina proiettano poi ai corpi genicolati laterali organizzati in lamine: ogni lamina riceve afferenze dall'occhio ipsilaterale o controlaterale. Le cellule del corpo genicolato proiettano allo strato IV delle aree corticali visive. È importante notare che esiste una rappresentazione punto a punto tra la retina e i vari centri visivi. A livello di ogni stazione si può, quindi, ricostruire una mappa del campo visivo (retinotopia).

Uno dei concetti più importanti acquisiti nel campo della fisiologia delle aree corticali è quello di organizzazione colonnare. Gruppi di neuroni che hanno caratteristiche fisiologiche simili (ps. risposta ad un particolare orientamento dello stimolo visivo, risposta all'occhio ipsilaterale o controlaterale) tendono a raggrupparsi sia funzionalmente che anatomicamente in colonne. Le colonne di dominanza oculare sono formate da neuroni che ricevono afferenze bilanciate da cellule della lamina ipsilaterale o controlaterale del corpo genicolato laterale (per lamina ipsilaterale e controlaterale si intende la lamina in cui terminano le afferenze dall'occhio ipsi o controlaterale). Nello strato IV della corteccia dei mammiferi si alternano zone i cui neuroni sono controllati dall'occhio controlaterale o ipsilaterale; negli strati superiori ed inferiori sono presenti neuroni binoculari, la cui risposta ad una stimolazione dei due occhi può essere più o meno bilanciata.

A) Sviluppo delle aree corticali visive: effetti da deprivazione binoculare e monoculare

Le caratteristiche funzionali ed anatomiche delle aree corticali vengono acquisite progressivamente durante lo sviluppo. Prima dell'apertura degli occhi (nel ratto e nel gatto al 14° giorno di vita, nelle scimmie al momento della nascita) le aree corticali visive sono innervate diffusamente da fibre provenienti da entrambi gli occhi. In seguito si riscontra una segregazione

delle fibre che porta ad una organizzazione dei neuroni in colonne di dominanza oculare e ad una diminuzione del numero delle cellule binoculari (Hubel and Wiesel 1963; Rakic, 1976; LeVay et al., 1978; per una review: Kalil, 1990). Secondo il modello proposto da Hubel e Wiesel alla nascita i terminali provenienti dalle lamine genicolate innervate dall'occhio ipsi e controlaterale sono disposti, nello strato IV, su territori sovrapposti. Successivamente si svilupperebbe un processo competitivo che porterebbe al prevalere di determinati terminali su altri. I terminali assonici "sconfitti" si ritirerebbero con la conseguente morte dei neuroni parenti. Questo processo porta, quindi, ad una riduzione della sovrapposizione di terminali e ad un maggiore raggruppamento di quelli rimanenti (processo di formazione delle colonne).

Tutti questi meccanismi sono indipendenti dalla visione delle forme che a questo stadio è ancora fortemente immatura. Uno dei fattori che sembra essere coinvolto è la scarica spontanea delle vie afferenti alla corteccia visiva. Il perchè alcuni terminali si ritirino ed altri no resta però un problema aperto.

La visione delle forme e quindi un'interazione attiva con l'ambiente comporta un ulteriore affinamento delle proprietà funzionali ed anatomiche dei neuroni delle aree visive corticali. I neuroni subiscono un modellamento dei loro campi recettivi (in genere diventano più piccoli), acquisiscono la selettività per l'orientamento e la direzione di movimento degli stimoli visivi. Anche le colonne di dominanza oculare vanno incontro a modificazioni successive fino ad assumere il tipo di distribuzione dell'adulto. Che l'interazione con l'ambiente circostante abbia un ruolo importante in questo periodo di sviluppo postnatale è dimostrato dal fatto che una deprivazione visiva binoculare protratta per un certo periodo impedisce il normale sviluppo dei neuroni corticali (Timney et al., 1978; Leventhal and Hirsch, 1980): i neuroni di un animale deprivato binocularmente (tenuto in un ambiente privo di luce) hanno le stesse proprietà di quelli studiati al momento dell'apertura degli occhi.

La visione della luce diffusa di per sé non sembra sufficiente per un normale sviluppo del sistema visivo: bambini affetti da cataratta congenita (Hiles and Wallar, 1977; von Noorden, 1978; Mohindra et al., 1983) presentano un'acuità visiva ridotta se il deficit non viene precocemente rimosso.

Anche una visione sbilanciata tra i due occhi che risulti in un'alterazione della visione binoculare (deprivazione monoculare) in un periodo dello sviluppo postnatale caratteristico della specie animale studiata (periodo critico) comporta nell'uomo, come nella scimmia, gatto e ratto un'alterazione permanente della circuitria delle aree corticali visive. Le alterazioni consistono nella 1) riduzione della sensibilità al contrasto e dell'acuità visiva dell'occhio deprivato, effetti che vanno sotto il nome di ambliopia (riduzione dell'acuità dell'occhio deprivato di almeno un fattore due rispetto all'occhio non deprivato), 2) incapacità dei neuroni corticali di rispondere alla stimolazione dell'occhio deprivato, con perdita dei neuroni binoculari, 3) riduzione delle

dimensioni delle colonne di dominanza oculare dell'occhio privato e riduzione delle dimensioni dei corpi cellulari di neuroni presenti nelle lamine dei corpi genicolati laterali innervate dall'occhio privato.

B) Modelli animali per lo studio dei fenomeni indotti dalla deprivazione monoculare

Storicamente il primo modello sperimentale per studiare gli effetti prodotti da una deprivazione monoculare effettuata nel periodo critico è stato descritto da Wiesel e Hubel nel gatto (1963) e successivamente nella scimmia (Hubel and Wiesel, 1977a; b). Essi scoprirono che deprivando un occhio mediante sutura delle palpebre, o più semplicemente deprivandolo della visione delle forme, applicando un mezzo traslucido anteriormente alla cornea, si osservava la riduzione del numero delle cellule che rispondevano ad entrambi gli occhi (neuroni binoculari) e all'occhio privato ed un aumento di quelle che rispondevano all'occhio non privato. In seguito, con prove comportamentali (Smith, 1981) e elettrofisiologiche (Snyder and Shapley, 1979) si è osservato la perdita di acuità visiva e di sensibilità al contrasto dell'occhio privato.

La deprivazione monoculare effettuata durante il periodo critico comporta anche un'alterazione anatomica: le colonne di dominanza oculare dell'occhio privato vanno incontro ad un restringimento (LeVay et al., 1977). Questo fenomeno è suddivisibile in due fasi temporali: 1) gli assoni del genicolato controllato dall'occhio privato si retraggono (riduzione delle colonne di dominanza oculare dell'occhio privato) con successiva riduzione delle dimensioni dei loro corpi cellulari (Guillery and Stelzner, 1970); 2) in una fase più avanzata gli assoni dell'occhio non privato si espandono e vanno ad occupare gli spazi neuronali lasciati liberi.

La durata del periodo critico varia in rapporto alla specie animale studiata: nell'uomo comprende i primi trenta mesi di vita postnatale (Hohmann and Creutzfeld, 1975), nelle scimmie i primi sei mesi di vita postnatale (Blakemore et al., 1970) e nel ratto pigmentato i primi 45 giorni di vita postnatale (Rothblat et al., 1978). Le alterazioni che derivano da una deprivazione monoculare effettuata in questo periodo non sono correggibili nella vita adulta. Se in un animale privato monocolarmente si deprivava della vista l'occhio normale, riaprendo le palpebre all'occhio precedentemente suturato (procedura nota come sutura inversa), si può assistere ad un recupero, in acuità visiva e sensibilità al contrasto dell'occhio ambliope ma non della binocularità (Crawford et al., 1989; Harwerth et al., 1989). Questo sta ad indicare che l'efficacia delle connessioni corticali può essere, non solo ridotta, ma anche aumentata in funzione della stimolazione retinica.

Una deprivazione monoculare, così come una sutura inversa, effettuata nella vita adulta non ha effetti.

Fin dai primi esperimenti di Hubel e Wiesel (1963) si è ipotizzato che i fenomeni indotti da una deprivazione monoculare siano ascrivibili ad una competizione delle fibre afferenti per lo spazio postsinaptico del neurone bersaglio. Le fibre controllate dall'occhio deprivato sarebbero meno competitive, in quanto meno attive.

Questa ipotesi necessita però di una precisazione: l'attività elettrica delle fibre afferenti allo strato IV della corteccia è importante sia per il suo valor medio che nella modulazione di tale valore, ovvero nel tipo di scarica di ogni singola fibra. Quest'ultima interpretazione è rafforzata dagli studi compiuti da Hubel e Wiesel (1965) sul gattino reso strabico. Nello strabico punti corrispondenti della retina non sono stimolati da punti corrispondenti del campo visivo. Quindi non c'è correlazione tra l'attività delle fibre del genicolato controllate dai due occhi senza che vi sia un grosso sbilanciamento fra le attività medie.

Quello che si riscontra negli animali così manipolati è che i neuroni corticali sono esclusivamente monoculari per l'uno o per l'altro occhio. Ne consegue che in assenza di correlazione tra l'attività elettrica delle fibre afferenti controllate dai due occhi manca la stabilizzazione delle due entrate sullo stesso neurone.

Una conferma ulteriore è venuta da studi compiuti da Singer et al. (1977) e da Stryker e Strickland (1984). Nel primo studio si è dimostrato che la differenza quantitativa di attività elettrica non è il vero fattore discriminante; infatti deprivando un occhio ad un gattino e privando l'altro della visione delle forme ma non della luce diffusa non si instaurano gli effetti della deprivazione. Nel secondo studio è stata fatta l'ipotesi che la formazione dei neuroni binoculari dipenda dalla correlazione tra l'attività delle fibre afferenti.

Dati ottenuti nel gattino in cui la scarica delle cellule gangliari retiniche era stata bloccata mediante iniezione intraoculare di tetratossina (TTX) hanno mostrato che la formazione dei neuroni binoculari avveniva solo quando una stimolazione artificiale dei due nervi ottici induceva in essi attività sincrone.

Dagli studi fin qui citati l'attività afferente e soprattutto il tipo di scarica delle fibre afferenti sembra il meccanismo che porta alla stabilizzazione o alla cancellazione di sinapsi. Ovviamente questa ipotesi implica che esista un qualche meccanismo che correli il tipo di scarica delle due entrate con lo stato funzionale del neurone postsinaptico. Dati recenti hanno mostrato che una deprivazione monoculare effettuata in gattini in cui i neuroni corticali visivi erano farmacologicamente inibiti (Reiter and Stryker, 1987), o tenuti in uno stato eccitatorio anomalo (Ramo et al., 1989) non induceva gli effetti classici, sopra descritti.

Da qui l'idea che la competizione sia basata sulla correlazione tra l'attività delle fibre afferenti e quella dei neuroni postsinaptici.

Potrebbe valere quindi l'ipotesi di plasticità formulata da Hebb (1949) la cui validità è stata provata in varie parti del sistema nervoso. Questa ipotesi dice che solo le entrate sinaptiche attive in modo sincrono con il neurone postsinaptico sono potenziate.

C) Deprivazione monoculare e potenziamento sinaptico

I primi effetti della deprivazione si possono misurare con metodi elettrofisiologici già dopo un giorno (Olson and Freeman, 1975) e la velocità con cui le cellule passano dalla binocularità a rispondere solo all'occhio aperto fa pensare che sotto la prima fase di questo fenomeno stiano meccanismi di potenziamento e di indebolimento delle sinapsi. I fenomeni che accompagnano una deprivazione monoculare potrebbero essere suddivisi in due gruppi che sembrano avere una successione temporale:

- 1) fenomeni che consistono nel potenziamento o nella depressione di determinate sinapsi;
- 2) fenomeni che portano alla stabilizzazione definitiva o alla cancellazione di sinapsi. In questa fase si evidenziano le modificazioni anatomiche precedentemente descritte.

Per potenziamento sinaptico si intende un rafforzamento delle connessioni sinaptiche che si traduce in un aumento del potenziale postsinaptico (EPSP), a parità di scarica afferente. Il meccanismo neurobiologico che sottostà al potenziamento di una sinapsi sembra coinvolgere un particolare tipo di recettore per gli aminoacidi eccitatori (acido aspartico e acido glutammico) il cui agonista è l'acido N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e detto quindi recettore NMDA. Il legame del ligando con il recettore NMDA è in grado di aprire una conduttanza al calcio solo se la membrana è già depolarizzata così da rimuovere un blocco voltaggio dipendente del canale operato dallo ione Magnesio.

Questo meccanismo è in grado, quindi, di mettere in relazione lo stato del potenziale di membrana postsinaptico con l'attività del terminale presinaptico che rilascia trasmettitore, come previsto dall'ipotesi Hebbiana.

Esistono prove che il recettore NMDA sia coinvolto nel potenziamento a lungo termine (LTP) sia nell'ippocampo (Harris et al., 1984) sia nella corteccia visiva (Artola and Singer, 1987): per LTP si intende un potenziamento sinaptico che persiste per un lungo periodo di tempo.

Perfondendo la corteccia visiva con APV, cioè bloccando i recettori NMDA, e deprivando monocolarmente l'animale non si producono gli effetti della deprivazione (Kleinschmidt et al., 1987). Si può interpretare questo dato come una mancanza di plasticità della corteccia visiva in assenza dei recettori NMDA. Inoltre, la presenza dei recettori NMDA nello strato IV della

corteccia visiva di gatto sembra correlare con il suo periodo critico (Bode-Greuel and Singer, 1989).

Più recentemente è stato proposto un modello che, in accordo a quanto ipotizzato precedentemente da Hebb, è in grado di spiegare sia il potenziamento che l'eventuale depressione di sinapsi. Secondo questo modello sarebbe importante il livello del potenziale di membrana della cellula target. Artola et al. (1987), hanno dimostrato che la stimolazione delle fibre afferenti alla corteccia visiva di ratto induce depressione sinaptica nei neuroni il cui potenziale di membrana sia di poco superiore al potenziale di riposo e potenziamento sinaptico per depolarizzazioni maggiori.

Gli esperimenti farmacologici su animali deprivati non sono iniziati con lo studio dei recettori NMDA. Nel 1976 Kasamatsu e Pettigrew hanno osservato che l'iniezione intraventricolare di 6-idrossidopamina, un neurotossico per le vie adrenergiche, impediva l'instaurarsi degli effetti provocati da una deprivazione monoculare; l'applicazione, successiva di noradrenalina sulla corteccia visiva comportava un ripristino delle capacità plastiche.

Successivamente Bear e Singer (1986) hanno dimostrato che la 6-idrossidopamina oltre a distruggere i neuroni catecolaminergici blocca anche la trasmissione colinergica: per bloccare gli effetti della deprivazione è necessario bloccare l'azione sia della noradrenalina che dell'acetilcolina. Nessuno dei due fattori è in grado di per se di agire sulla plasticità, ma insieme bloccano gli effetti della deprivazione monoculare.

Sia la noradrenalina che l'acetilcolina possono avere un'azione facilitante, bloccando una corrente potassio (Madison and Nicoll, 1982; Halliwell and Adams, 1982). L'attività di una od entrambe queste vie potrebbe quindi potenziare l'azione di altre entrate inibendo la ripolarizzazione della membrana ed aumentando quindi la possibilità che i recettori NMDA si attivino.

Il modello che emerge da questi studi presuppone che il potenziamento sinaptico rappresenti il primo meccanismo che porta alla stabilizzazione di una sinapsi.

D) Deprivazione monoculare e modificazioni anatomiche

La problematica su esposta deve essere allargata al problema di come le variazioni funzionali sinaptiche possano essere mantenute a lungo termine e come si possa verificare la stabilizzazione o la depressione sinaptica con successiva retrazione dei terminali assonici.

Il primo passo di un'azione a lungo termine sembra essere in relazione all'entrata di Calcio mediata dai recettori NMDA (Harris et al., 1984); infatti il potenziamento a lungo termine è impedito dall' iniezione cellulare di chelanti del Calcio (Lynch et al., 1983).

L'entrata del Calcio è stata dimostrata interagire con numerosi fattori (per una review: Gustafsson and Wigstrom, 1988).

Se la letteratura sul potenziamento sinaptico è particolarmente abbondante in alcune strutture del SNC, quali l'ippocampo ed il cervelletto, resta ancora carente per ciò che concerne la corteccia visiva, rendendo difficile l'individuazione dei vari fattori che regolano la plasticità visiva corticale.

I fenomeni anatomici causati da una deprivazione monoculare come la retrazione assonale e la riduzione di volume del corpo cellulare dei neuroni del corpo genicolato non sono interpretabili alla luce dei modelli proposti.

Entrambi gli effetti descritti fanno pensare alla presenza nella corteccia visiva di un qualche fattore, la cui scarsità alteri il normale trofismo dei neuroni del corpo genicolato laterale: in altri termini le alterazioni anatomiche che si associano ad una deprivazione monoculare potrebbero derivare da una carenza di fattore neurotrofico, analogamente a quanto dimostrato in altre strutture del SNC e periferico (Levi-Montalcini, 1987; per una review: Thoenen et al., 1988).

E) Per una teoria neurotrofica della plasticità visiva corticale

Dagli studi condotti sulla deprivazione monoculare e più in generale sulla plasticità visiva corticale emergono due domande:

- 1) per cosa competono i terminali assonici in corteccia visiva;
- 2) qual'è il messaggio retrogrado che informa le fibre afferenti dello stato di attivazione o inibizione del neurone postsinaptico e mette in moto quei meccanismi atti a stabilizzare o a cancellare una sinapsi.

Recentemente, è stata formulata l'ipotesi che i terminali assonici della corteccia visiva competano per un fattore neurotrofico, prodotto in quantità limitate dalle cellule bersaglio. La produzione ed il rilascio di questo fattore neurotrofico sarebbe sotto il controllo dell'attività elettrica delle fibre afferenti. Le fibre inattive sarebbero penalizzate, in quanto assumerebbero una quantità di fattore neurotrofico inferiore al loro fabbisogno. Questo deficit comporterebbe una depressione sinaptica con successivo silenzio sinaptico, retrazione dei terminali e riduzione di volume dei neuroni deficitari. L'ipotesi neurotrofica, quindi, fornirebbe una chiave interpretativa degli effetti anatomici causati da una deprivazione monoculare.

Questa ipotesi è stata verificata su ratti deprivati monocolarmente durante il periodo critico e trattati con "nerve growth factor" (NGF). Il NGF rappresenta un fattore neurotrofico ben caratterizzato, sia sotto il profilo molecolare che funzionale (Levi-Montalcini, 1987; Levi et al., 1988), la cui azione trofica si esplica nel sistema nervoso periferico ed in quello centrale (Seiler and Schwaab, 1984; Kromer, 1987; Hartika and Hefti, 1988). Nella corteccia visiva di ratto

sono presenti sia il NGF (Large et al., 1986) che il suo recettore (Yan and Johnson, 1988; Koh and Loy, 1989; Pioro and Cuello, 1990); l'espressione quantitativa di entrambi cambia durante lo sviluppo postnatale (Large et al., 1986; Hayashi et al., 1989).

L'iniezione intraventricolare di NGF durante il periodo critico ha impedito l'instaurarsi degli effetti prodotti dalla deprivazione monoculare. L'acuità visiva e la sensibilità al contrasto dell'occhio deprivato di ratti trattati con NGF sono risultate sostanzialmente normali (Berardi et al., 1990 a). RegISTRAZIONI effettuate nella corteccia visiva del ratto hanno evidenziato una percentuale di cellule binoculari e una distribuzione in classi di dominanza oculare dei ratti deprivati e trattati con NGF sostanzialmente sovrapponibile a quella del ratto normale (Berardi et al., 1990 b).

Il NGF previene gli effetti ambliopici della deprivazione monoculare

A) Materiali e metodi

L'animale usato nei nostri esperimenti è il ratto pigmentato. Esso ha un tempo di riproduzione corto ed una velocità di sviluppo elevata; questa condizione risulta particolarmente vantaggiosa per condurre studi sullo sviluppo. Il sistema visivo del ratto non è però molto studiato dal punto di vista elettrofisiologico e quindi, prima di procedere agli esperimenti in animali trattati, si è cercato di comprendere le sue caratteristiche funzionali. Per questo motivo sono stati esaminati 16 ratti normali.

Su 9 ratti è stata effettuata la deprivazione monoculare (MD) per mezzo della sutura delle palpebre dal quindicesimo giorno di vita postnatale (giorno di apertura degli occhi nel ratto) per circa un mese. Questo periodo corrisponde all'intero periodo critico del ratto (Rothblat et al., '78; Rothblat e Schwartz, '79). Dati da noi ottenuti hanno mostrato che una deprivazione eseguita a 21 giorni produce effetti ambliopici minori rispetto ad una deprivazione eseguita a 15 giorni, mentre una deprivazione eseguita oltre i 45 giorni non produceva effetti.

Dopo aver stabilito le capacità visive del ratto e caratterizzato gli effetti ambliopici indotti dalla deprivazione monoculare in questo animale, si è cercato di verificare la possibile implicazione del NGF nei fenomeni di plasticità sottostanti gli effetti della deprivazione monoculare. Non essendo noti precedenti tentativi in questo senso e mancando evidenze per la determinazione dei possibili siti d'azione, si è adottato il procedimento delle iniezioni intraventricolari. In seguito si è delimitata l'area dove potrebbe essere il sito d'azione del NGF mediante applicazioni locali di NGF nei pressi della corteccia visiva (dati non riportati nel presente lavoro).

Il NGF è stato applicato seguendo il seguente protocollo sperimentale:

sono state effettuate iniezioni intraventricolari (2 microlitri in soluzione di 1-1.6 microgrammi/microlitro in soluzione salina) a giorni alterni, per tutto il periodo della deprivazione, all'interno del ventricolo laterale. Il punto di iniezione è stato trovato mediante coordinate stereotassiche e controllato mediante l'iniezione di un colorante (pontamina) che diffondeva in tutti i ventricoli.

Ratti deprivati di controllo sono stati trattati con Citocromo C (molecola con stesso punto isoelettrico dell'NGF ma non dotata di effetti neurotrofici) e con soluzione fisiologica secondo le stesse metodiche utilizzate per iniettare il NGF.

Al fine di valutare le modificazioni indotte dalla deprivazione monoculare, e le successive variazioni provocate dal trattamento con NGF sulla fisiologia del sistema visivo, abbiamo utilizzato i seguenti test elettrofisiologici:

- elettroretinogramma da pattern e da flash;
- potenziali evocati visivi da pattern;
- registrazioni extracellulari dell'attività elettrica di singoli neuroni corticali.

Tutti i ratti indagati sono stati sottoposti ad anestesia mediante un' iniezione intraperitoneale di uretano (6 cc/Kg, soluzione 20%; Sigma) e montati sull' apparato stereotassico. Durante l'esperimento la temperatura corporea era mantenuta intorno ai 38 gradi e veniva monitorizzata la frequenza cardiaca.

Lo studio delle proprietà dell' elettroretinogramma da reticoli alternanti (P-ERG) è stato condotto su quattro ratti su cui era stata effettuata la deprivazione monoculare.

La registrazione del P-ERG veniva effettuata per mezzo di elettrodi di argento posti sulla palpebra inferiore a contatto con la cornea, previa anestesia locale con Novesina 0.4%.

Registrazioni di potenziali evocati visivi da reticoli alternanti (VEP) sono state eseguite su sedici ratti normali, su nove deprivati monocolarmente, su nove deprivati monocolarmente in cui era stato effettuato il trattamento intraventricolare con NGF.

La registrazione del segnale corticale evocato veniva effettuata utilizzando capillari di vetro con punta di diametro tra 1 e 4 micron riempiti da una soluzione di cloruro di sodio 3 molare. L'elettrodo registrante veniva posto nella porzione binoculare della corteccia visiva (area OC1B) e la penetrazione avveniva per mezzo di un micromanipolatore.

Lo stimolo visivo era costituito da un reticolo di barre sinusoidali che si alternavano nel tempo. Le frequenze spaziali dei reticoli variavano da 0.1 a 1.2 cicli/grado; la frequenza temporale di inversione era di 6 Hz nel caso del P-ERG e di 4Hz per i VEP; il contrasto era mantenuto al 40%-50%, tranne quando si voleva determinare l'acuità visiva (per definizione era usato il contrasto massimo).

Lo stimolo visivo veniva generato su un display (HP 1300A) posizionato a circa venti centimetri dall' occhio in esame e centrato a circa quaranta gradi medialmente dall' asse

pupillare. La posizione della pupilla veniva fissata all'inizio della seduta sperimentale mediante anelli metallici che tenevano il bulbo oculare, collegati con sbarrette solidali all'apparato stereotassico.

Il segnale bioelettrico era amplificato, filtrato tra 0.5 e 25-30 Hz (8 dB per ottava) e sottoposto a processo di media computerizzata (tecnica dell' "averaging").

Ciascuna registrazione di P-ERG e VEP veniva effettuata monocularmente previa occlusione di un occhio.

Ai fini di verificare possibili variazioni delle proprietà elettriche dei neuroni corticali in seguito al trattamento usato sono state eseguite delle registrazioni da singoli neuroni corticali negli stessi punti di registrazione adoperati per i potenziali evocati.

La risposta dei neuroni era evocata da stimoli luminosi, costituiti da barre o campi circolari. Essi potevano variare per dimensione, luminosità ed eventuale orientamento.

Per ogni singolo neurone veniva valutata l'attività elettrica spontanea, il campo recettivo e la sua classe di dominanza oculare, la selettività per l'orientamento dello stimolo visivo.

B) Risultati

Ratti normali di controllo.

Nella figura 1 (A e B) è rappresentata l'ampiezza della seconda armonica del VEP in funzione della frequenza spaziale dello stimolo. È importante far notare che per frequenze temporali superiori ai 2 Hz il VEP assume una forma sinusoidale la cui frequenza è doppia (seconda armonica) della frequenza di inversione del reticolo visivo.

I punti riportati nella Fig 1 rappresentano i valori assoluti delle medie delle risposte di sedici ratti normali; l'area ombreggiata si riferisce all'intervallo di oscillazione delle ampiezze (media + SD). L'acuità visiva è stata registrata a contrasto massimo (simboli sull'asse delle ascisse, la barra si riferisce alla SD). I dati sono stati riportati separatamente per la corteccia controlaterale all'occhio stimolato (A) e per quella ipsilaterale all'occhio stimolato (B). L'ampiezza media del segnale è globalmente più bassa nel caso della corteccia ipsilaterale.

L'acuità visiva media è risultata 1.1 cicli/grado (SD = 0.1) per la corteccia controlaterale (Fig. 1 A) e 1 cicli/grado (SD= 0.14) per la corteccia ipsilaterale (Fig. 1 B).

Ratti con deprivazione monoculare.

Come si può vedere dalla figura 1 (A e B) la deprivazione monoculare riduce l'acuità visiva.

L'acuità visiva media ottenuta nella corteccia visiva controlaterale all'occhio deprivato è risultata 0.4 cicli/grado (SD 0.1), mentre quella della corteccia ipsilaterale all'occhio deprivato

0.3 cicli/grado (SD=0.1). È importante rilevare che l'acuità visiva era ridotta in tutti i ratti indagati.

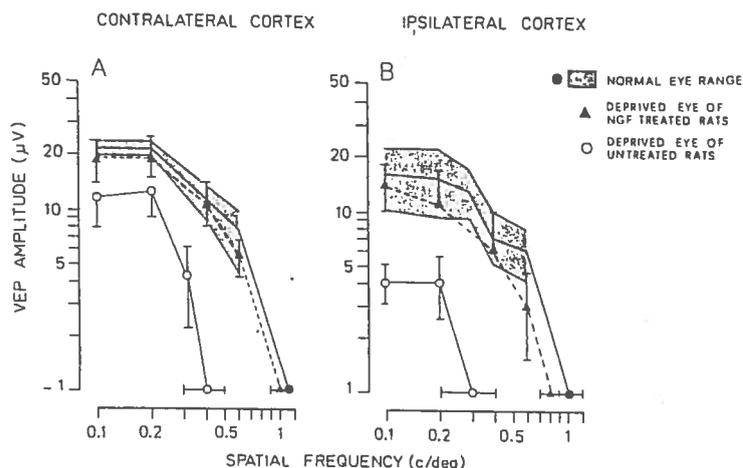


Figura 1. Rappresentazione grafica delle ampiezze dei VEP in funzione delle frequenze spaziali di stimolazione: sulle ascisse viene riportata la frequenza spaziale dei reticoli in cicli/grado, mentre sulle ordinate viene espressa l'ampiezza del VEP in μV . L'area ombreggiata rappresenta l'intervallo entro cui cadono i segnali registrati per gli occhi normali (valore medio \pm una deviazione standard). I cerchi chiari rappresentano la media dei dati ottenuti per l'occhio deprivato nei ratti deprivati e non trattati ($N=9$). I triangoli scuri rappresentano la media dei dati ottenuti per l'occhio deprivato per ratti deprivati e trattati con NGF intraventricolare ($N=9$). I simboli sull'ascissa rappresentano le acuità visive medie (per acuità visiva si intende il reticolo di maggior frequenza spaziale che, a massimo contrasto, è capace di evocare un potenziale diverso dal rumore): cerchio chiaro, occhi deprivati in animali non trattati; cerchio scuro, occhi normali; triangolo scuro occhi deprivati in ratti trattati con NGF. Il contrasto dello stimolo visivo, tranne che per l'acuità, era del 30-40%; la luminanza media di 14 cdlm^2 ; la frequenza temporale era di 3-4 Hz.

In conclusione, la deprivazione monoculare effettuata durante il periodo critico è in grado di provocare una notevole riduzione dell'acuità visiva anche nel ratto.

Esperimenti condotti registrando su tre ratti deprivati monocolarmente hanno mostrato un'acuità visiva alterata solo quando i potenziali evocati erano registrati nella corteccia visiva binoculare (0.48 cicli/grado, SD=0.03), mentre nella porzione di corteccia visiva monoculare l'acuità visiva non è risultata sostanzialmente diversa da quella normale (0.9 cicli/grado, SD=0.05).

Dai precedenti risultati si può concludere che il deficit di acuità visiva indotto da una deprivazione monoculare è causato da processi competitivi che si sviluppano solo nella porzione di corteccia binoculare.

Si può escludere che i fenomeni ambliopici da noi indotti possano risultare da danneggiamenti riportati nelle manipolazioni a cui sono stati sottoposti gli occhi; infatti il P-ERG registrato in quattro ratti monocolarmente deprivati ha evidenziato una risoluzione spaziale (la più alta frequenza spaziale in grado di evocare un P-ERG con contrasto massimo dello stimolo) media per l'occhio deprivato di 0.85 cicli/grado (SD= 0.05), non significativamente differente (two tailed t-test, $p>0.05$) da quella ottenuta negli occhi non deprivati (0.95 cicli/grado SD = 0.1).

Ratti trattati con NGF

Come si può vedere dalla figura 1 (A e B) le ampiezze della seconda armonica dei segnali registrati a contrasti del 30-40% da ratti trattati (triangoli scuri) sono all'interno dell'intervallo in cui cadono le risposte normali (aree ombreggiate). I punti rappresentano il valore assoluto delle ampiezze medie dei potenziali registrati da nove ratti iniettati intraventricolarmente con NGF.

L'acuità visiva media dell'occhio deprivato di questi ratti è 1 ciclo/grado (SD = 0.1) per la corteccia controlaterale e 0.8 cicli/grado (SD = 0.1) per la corteccia ipsilaterale (registrazioni con contrasto 40-50%). Non si hanno quindi differenze significative tra l'acuità visiva di un occhio normale e un occhio deprivato in un animale trattato con NGF (two tailed t test, $p>0.1$).

Gli animali iniettati con citocromo c o con soluzione fisiologica danno risposte indistinguibili dai deprivati privi di iniezioni e quindi si possono escludere effetti dovuti alle modalità di iniezione sulle capacità visive degli animali trattati.

Registrazioni extracellulari dell'attività elettrica di singoli neuroni corticali.

La scarica spontanea media di potenziali di azione rilevata su cellule (N=24, media=10/sec, SD=5) di ratti normali, cellule (N=16, media=10/sec, SD=8) di ratti deprivati trattati con NGF per mezzo di iniezioni intraventricolari, non presenta differenze secondo il tipo di ratto da noi preso in esame.

Per assicurarsi ulteriormente che il NGF non inducesse nei neuroni corticali un aumento aspecifico dell'eccitabilità sono stati registrati due ratti durante il trattamento (la registrazione veniva effettuata due ore dopo l'ultima iniezione) con NGF. Entrambi non mostrano sostanziali differenze dall'attività spontanea dei neuroni di ratti non trattati.

E inoltre importante osservare che le cellule di ratti trattati con NGF non perdono, almeno grossolanamente, la loro selettività per l'orientamento e per le dimensioni dello stimolo.

Questi risultati indicano che il NGF, di per sè, non altera le proprietà funzionali dei neuroni visivi.

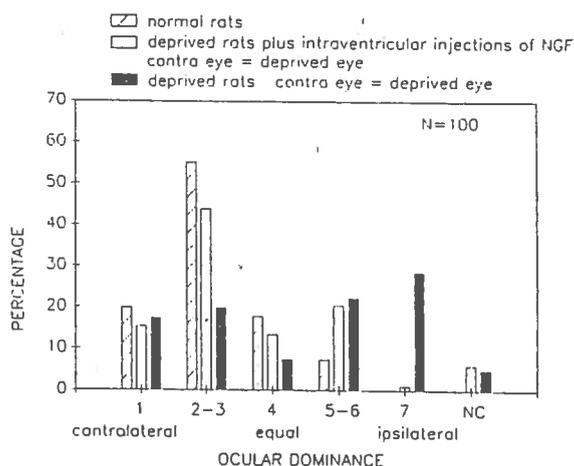


Figura 2. Distribuzione della dominanza oculare sulla base di registrazioni di singoli neuroni della corteccia visiva primaria in ratti normali (barre tratteggiate), ratti con deprivazione monoculare (barre scure) e ratti con deprivazione monoculare e iniezioni intravitricolari di NGF (barre chiare). Le registrazioni venivano effettuate nell'emisfero controlaterale all'occhio deprivato. $N=100$ è riferito al numero di cellule registrate per ciascun gruppo di animali. 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 alla stimolazione 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. NC rappresenta quei neuroni che non è stato possibile classificare con stimoli visivi.

Per ciò che concerne la distribuzione in classi di dominanza oculare nel ratto normale bisogna rilevare uno spostamento dell'istogramma verso sinistra, rispetto ad una distribuzione normale (Fig. 2, barre tratteggiate). Questo fenomeno è causato da una prevalenza delle afferenze dell'occhio controlaterale (le fibre ipsilaterali rappresentano solo il 5-6%) per cui la percentuale di neuroni corticali controllati dall'occhio controlaterale risulta essere maggiore.

Nei ratti monocolarmente deprivati è stata osservata una diminuzione percentuale di neuroni binoculari (ratto normale 80%; ratto deprivato 43%). Inoltre, la percentuale dei neuroni controllati dall'occhio deprivato (nella nostra procedura sperimentale l'occhio deprivato è controlaterale rispetto alla corteccia registrata) si riduce al 27% (nel ratto normale l'occhio

controlaterale controlla il 75%) con un conseguente spostamento dell'istogramma della distribuzioni verso destra (verso l'occhio ipsilaterale non deprivato) (Fig. 2, barre chiare).

Nei ratti trattati con NGF le classi di dominanza oculare erano pressochè sovrapponibili a quelle riscontrate nei ratti normali (fig. 2, barre scure).

C) Conclusioni

Una somministrazione esogena di NGF previene gli effetti ambliopici causati da una deprivazione monoculare effettuata durante il periodo critico. Questo risultato non è ascrivibile a effetti aspecifici, quali quelli causati da manipolazione dell'animale; infatti ratti di controllo deprivati monocolarmente, trattati con citocromo c o soluzione fisiologica presentano ambliopia.

Registrazioni effettuate da singole cellule permettono di escludere che somministrazioni ripetute di NGF abbiano causato effetti tossici sui neuroni corticali, andando ad interferire con lo sviluppo delle loro proprietà funzionali.

I risultati emersi in questo lavoro suggeriscono, quindi, un ruolo specifico per il NGF nella plasticità visiva corticale, sebbene i seguenti punti debbano essere maggiormente approfonditi:

- 1) conoscere l'esatta distribuzione delle cellule corticali che sintetizzano e rilasciano NGF;
- 2) conoscere la distribuzione delle fibre che presentano il recettore per il NGF;
- 3) studiare gli effetti indotti da una deprivazione monoculare sui due precedenti parametri.

L'ipotesi neurotrofica della plasticità visiva corticale si fonda su un'interazione tra attività elettrica delle fibre afferenti alla corteccia ed il rilascio e/o l'assunzione di NGF in corteccia visiva.

Il controllo che esercita l'attività elettrica sarebbe di duplice natura: sulla quantità di NGF rilasciata dalla cellula bersaglio (due afferenze la cui attività sia correlata provocano un rilascio maggiore di NGF) e/o sull'assunzione del NGF.

Per quanto concerne il primo meccanismo è necessario supporre un rilascio di NGF da parte della cellula bersaglio spazialmente localizzato in corrispondenza dei terminali sinaptici delle fibre afferenti. Secondo questa ipotesi solo le fibre più attive disporrebbero del NGF rilasciato dai neuroni target. Al momento non si conoscono risultati sperimentali sul rilascio spazialmente localizzato del NGF.

La seconda ipotesi prende in considerazione un rilascio del NGF, non spazialmente localizzato, la cui entità sia definita dal valor medio dell'attività afferente: più eccitazione un neurone target riceve, maggiore è il rilascio di NGF. La competizione per assumere il NGF avverrebbe a livello delle fibre afferenti che potrebbero regolare la velocità di assunzione e trasporto del NGF o la quantità di recettore presente.

I dati sin qui riassunti sulla deprivazione monoculare sembrano indicare che in abbondanza di NGF l'attività elettrica delle fibre afferenti non è un fattore limitante l'assunzione di NGF. Solo in presenza di quantità limitate di NGF si svilupperebbero fenomeni competitivi. Una diminuzione della quantità fisiologica di NGF in corteccia visiva durante lo sviluppo esalterebbe, quindi, i fenomeni competitivi. La manipolazione quantitativa del NGF sarebbe capace di impedire o di innescare di per sè fenomeni competitivi nella corteccia visiva, indipendentemente da cambiamenti di attività elettrica.

Numerosi punti della teoria neurotrofica devono essere ancora chiariti. In particolare, è carente la conoscenza delle interazioni tra attività elettrica, rilascio dei neurotrasmettitori, recettori postsinaptici coinvolti nel potenziamento ed eventuale sintesi di fattori neurotrofici.

Ci sembra importante, però, aver dimostrato che si può modulare, mediante somministrazione esogena di NGF, i fenomeni plastici che si accompagnano allo sviluppo postnatale della corteccia visiva. Questo risultato, oltre ad avere importanza per l'elaborazione di nuove teorie sullo sviluppo delle aree corticali nel mammifero, potrebbe avere implicazioni terapeutiche per gli effetti ambliopici che molteplici patologie oculari sono in grado di produrre.

Bibliografia

- Artola A. Singer W. *Nature* 330:649-652 1987
 Artola A. Brocher S. Singer W. *Nature* 347:69-72 1990
 Bear M.F. Singer W. *Nature* 320:172-176 1986
 Berardi N. Carmignoto G. Domenici L. Maffei L. *J. Physiol. (London)* 422:9P 1990
 Berardi N. Carmignoto G. Cremisi F. Domenici L. Maffei L. Parisi V. Pizzorusso T. *J. Physiol. (London)* In stampa 1991
 Blakemore C. Garey L.J. Vital-Durand F. *J. Physiol. (London)* 283:223-262 1978
 Bode-Greuel K.M. Singer W. *Dev. Brain Res.* 46:197-204 1989
 Crawford M.L.J. deFaber J.-T. Harwerth R.S. Smith III E.L. von Noorden *Exp. Brain Res.* 74:338-347 1989
 Guillery R.W. Stelzner D.J. *J. Comp. Neurol.* 139:413-422 1970
 Gustafsson B. Wigstrom H. *Trends Neurosci.* 11:156-162 1988
 Halliwell J.V. Adams P.R. *Brain Res.* 250:71-92 1982
 Harris E.W. Ganong A.H. Cotman C.W. *Brain Res.* 323:132-137 1984
 Hartikka J. Hefti F. *J. Neurosci.* 8:2967-2985 1988
 Harwerth R.S. Smith III E.L. Crawford M.L.J. Von Noorden G.K. *Exp. Brain Res.* 74:327-337 1989
 Hayashy M. Yamashita A. Shimizu K. *Neuroscience*, 36, 683-689 1989
 Hebb D.O. "The organization of behavior" *John Wiley, New York* 1949
 Hiles D.A. Wallar P.H. *Int. Ophthal. Clinics* 17:265-282 1977
 Hohman A. Creutzfeldt O.D. *Nature* 254:613-614 1975
 Hubel D.H. Wiesel T.N. *J. Neurophysiol.* 28:1041-1059 1965
 Hubel D.H. Wiesel T.N. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 198:1-59 1977
 Hubel D.H. Wiesel T.N. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 278:377-409 1977
 Kalil R.E. *Le Scienze* 194:206-209 1990
 Kasamatsu T. Pettigrew J.D. *Science* 194:206-209 1976
 Kleinschmidt A. Bear M.F. Singer W. *Science* 238:355-358 1987
 Kromer L.F. *Science* 235:214-216 1987
 Koh S. Loy R. *J. Neurosci.* 9:2999-3018 1989

- Large T.H. Bodary S.C. Clegg D.O. Weskamp G. Otten U. Reichardt L.F. *Science* 234:352-355 1986
LeVay S. Stryker M.P. Shatz C.J. *J. Comp. Neurol.* 179:223-244 1978
LeVay S. Wiesel T.N. Hubel D.H. *J. Comp. Neurol.* 191:1-51 1977
Leventhal A.G. Hirsch H.V.B. *J. Neurophysiol.* 43:1111-1132 1980
Levi A. Biocca S. Cattaneo A. Calissano P. *Mol. Neurobiol.* 2:201-226 1988
Levi-Montalcini R. *Science* 237:1154-1162 1987
Lynch G. Larson J. Kelso S. Barrionuevo G. Schottler F. *Nature* 305:719-721 1983
Madison D.V. Nicoll R.A. *Nature* 299:636-638 1982
Mohindra I. Jacobson S.G. Held R. *Doc. Ophthalmol.* 55:237-249 1983
Olson C.R. Freeman R.D. *J. Neurophysiol.* 38:26-32 1975
Pioro E.P. Cuello A.C. *Neuroscience* 34:57-87 1990
Rakic P. *Nature* 261:467-471 1976
Ramo A.S. Paradiso M.A. Freeman R.D. *Exp. Brain Res.* 7:285-296 1989
Reiter H.O. Stryker M.P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:3623-3627 1987
Rothblat L.A. Schwartz M.L. Kasdan P.M. *Brain Res.* 158:456-460 1978
Rothblat L.A. Schwartz M.L. *Brain Res.* 161:156-161 1979
Seiler M. Schwab M.E. *Brain Res.* 300:33-39 1984
Singer W. Rauschecker J. Werth R. *Brain Res.* 134:568-572 1977
Smith D.C. *J. Comp. Neurol.* 198:667-676 1981
Snyder A. Shapley R. *Exp. Brain Res.* 37:73-86 1979
Stryker M.P. Strickland S.L. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25S No. 3 278 1984
Timney B. Mitchell D.E. Giffin F. *Exp. Brain Res.* 31:547-560 1978
Thoenen H. Bandtlow C. Heumann R. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 109: 145-178 1987
Wiesel T.N. Hubel D.H. *J. Neurophysiol.* 26:1003-1017 1963
von Noorden G.K. *Ophthalmology* 85:496-504 1978
Yan, Q. Johnson E.M. *J. Neurosci.* 8:3481-3498 1988