

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
**SCIENZE VETERINARIE**

Ciclo XXVII

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H1**

**Settore Scientifico disciplinare: VET 01**

**CARATTERISTICHE ANATOMICHE E  
NEUROCHIMICHE DELLA FORMAZIONE  
IPPOCAMPALE DI CANE**

**Presentata da: Dott.ssa ANNA GARDINI**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Carlo Tamanini**

**Relatore**

**Prof. Cristiano Bombardi**

**Esame finale anno 2015**



# INDICE

<b>Introduzione.....</b>	<b>pag. 1</b>
--------------------------	---------------

## PARTE PRIMA

<b>1. Anatomia della formazione ippocampale.....</b>	<b>pag. 5</b>
1.1 Regioni della formazione ippocampale.....	pag. 5
1.2 Organizzazione tridimensionale della formazione ippocampale di ratto.....	pag. 6
1.3 Circuito ippocampale.....	pag. 8
1.4 Principali fasci della formazione ippocampale di ratto.....	pag. 10
1.5 Caratteristiche della formazione ippocampale dei Primati.....	pag. 14
<b>2. Giro dentato.....</b>	<b>pag. 15</b>
2.1 Organizzazione citoarchitettónica.....	pag. 15
2.2 Connessioni intrinseche.....	pag. 23
2.3 Connessioni estrinseche.....	pag. 29
<b>3. Ippocampo propriamente detto.....</b>	<b>pag. 33</b>
3.1 Organizzazione citoarchitettónica.....	pag. 33
3.2 Connessioni intrinseche.....	pag. 44
3.3 Connessioni estrinseche.....	pag. 50
<b>4. Subicolo.....</b>	<b>pag. 55</b>
4.1 Organizzazione citoarchitettónica.....	pag. 55
4.2 Connessioni intrinseche.....	pag. 56
4.3 Connessioni estrinseche.....	pag. 57
<b>5. Classificazione neurochimica degli interneuroni     presenti nella formazione ippocampale.....</b>	<b>pag. 67</b>
5.1 Neurotrasmettitori classici.....	pag. 67
5.2 Interneuroni contenenti proteine leganti il calcio, neuro peptidi e ossido nitrico.....	pag. 69

## PARTE SECONDA

<b>6. Scopo della ricerca.....</b>	<b>pag. 95</b>
<b>7. Materiali e metodi.....</b>	<b>pag. 99</b>
7.1 Istologia classica e immunoperossidasi.....	pag. 99

7.2 Risonanza magnetica della formazione ippocampale.....	pag. 106
<b>8. Risultati.....</b>	<b>pag. 109</b>
8.1 Formazione ippocampale di cane: organizzazione anatomica e distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio.....	pag. 109
8.1.1 Organizzazione anatomica.....	pag. 109
8.1.2 Caratteristiche generali dell'immunostaining.....	pag. 110
8.1.3 Distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio.....	pag. 111
8.2 Comparazione tra le caratteristiche anatomiche e neurochimiche della formazione ippocampale di cani giovani e vecchi.....	pag. 123
8.2.1 Analisi morfometrica sui preparati colorati con tionina.....	pag. 123
8.2.2 Quantificazione dei neuroni esprimenti le proteine leganti il calcio.....	pag. 128
8.3 Comparazione della formazione ippocampale di cani giovani e vecchi alla risonanza magnetica.....	pag. 134
<b>9. Discussione e conclusioni.....</b>	<b>pag. 139</b>
9.1 Formazione ippocampale di cane: organizzazione anatomica e distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio.....	pag. 139
9.2 Comparazione tra le caratteristiche anatomiche e neurochimiche della formazione ippocampale di cani giovani e vecchi.....	pag. 141

## **Bibliografia**

## **Figure**

# INTRODUZIONE

La formazione ippocampale è una delle zone encefaliche più studiate in quanto gioca un ruolo fondamentale nella formazione della memoria ed è un ottimo modello di plasticità neuronale e sinaptica, oltre che di network neuronale. Inoltre è coinvolta in numerosi disordini neurologici tra i quali Alzheimer, epilessia e malattie cerebrovascolari.

La formazione ippocampale è costituita da tre strutture: giro dentato, ippocampo propriamente detto (campi CA3, CA2 e CA1) e subicolo (Amaral e Lavenex, 2007).

Tuttavia questa è una definizione recente: questa area encefalica è stata individuata circa quattro secoli fa e nel corso degli anni è stata nominata in modi diversi.

Il termine ippocampo (derivante dal greco hippocampus) fu coniato per la prima volta nel XVI secolo da Arantius (1587); secondo Arantius la forma tridimensionale dell'ippocampo dell'Uomo ricordava un hippocampus, cioè un cavalluccio marino.

Nel 1742, Garengeot rinominò l'ippocampo cornu ammonis, corno d'Ammon, riferendosi alla divinità egiziana Amun Kneph, il cui simbolo era un ariete. Oggigiorno, nonostante il termine corno d'Ammon sia caduto in disuso, le abbreviazioni CA3-CA1 si riferiscono a questa nomina ormai obsoleta.

Attualmente la Nomina Anatomica riconosce il termine ippocampo come termine standard per riferirsi alla parte di formazione ippocampale che sporge sul pavimento del terzo ventricolo.

La formazione ippocampale inizialmente era considerata parte del rinencefalo, un insieme di strutture prosencefaliche correlate con il senso dell'olfatto.

Nel 1947 Alf Brodal osservò che animali anosomici come i delfini avevano un ippocampo ben sviluppato e quindi intuì che tale struttura doveva possedere altre funzioni oltre a quella olfattiva.

Secondo il neurologo James Papez la formazione ippocampale era la componente principale del cosiddetto circuito di Papez. Secondo tale modello, a questo livello si aveva la raccolta e l'integrazione delle emozioni che poi venivano convogliate all'ipotalamo. Da qui o rientravano nel circuito o suscitavano un'appropriata risposta emozionale (Papez 1937).

Nonostante l'ammirevole lavoro fatto da Papez, considerando anche gli scarsi mezzi a disposizione, attualmente l'espressione emozionale si attribuisce ad un'altra struttura presente nel lobo temporale, il complesso amigdaloideo.

Per molto tempo le strutture che costituiscono la formazione ippocampale sono state annoverate tra i componenti del sistema limbico. Secondo Broca (1878) *le grand lobe limbique* includeva strutture corticali e sottocorticali che circondavano il sistema ventricolare encefalico. A partire dagli anni '50 le regioni facenti parte del sistema limbico sono aumentate ulteriormente, arrivando a comprendere il complesso amigdaloideo, la sostanza grigia periaqueduttale e i nuclei del setto.

Secondo Amaral e Lavenex (2007) la formazione ippocampale non rientra nel sistema limbico, ma è un sistema funzionale indipendente, anche se interconnessa ad altri sistemi encefalici.

# **Parte prima**



# **1. ANATOMIA DELLA FORMAZIONE IPPOCAMPALE**

## **1.1. REGIONI DELLA FORMAZIONE IPPOCAMPALE**

Ciascuna delle tre regioni che compone la formazione ippocampale ha delle peculiarità sia in termini anatomici che in termini funzionali.

Il giro dentato è una regione di corteccia cerebrale trilaminare con una caratteristica forma a V o U. La sua struttura non varia particolarmente lungo l'estensione della formazione ippocampale e non mostra sottoregioni.

Tuttavia, per discutere le sue caratteristiche e facilitarne l'individuazione, risulta utile individuare tre porzioni: porzione soprapiramidale (situata tra CA3 e CA1, separata dalla fessura ippocampale), porzione infrapiramidale (opposta alla precedente) e cresta (zona di unione, all'apice della V o U).

L'ippocampo propriamente detto, soprattutto nei Roditori, è divisibile in una zona caratterizzata da cellule di grandi dimensioni (regione inferiore, vicino al giro dentato) e un'area con cellule più piccole (regione superiore) (Ramon y Cajal (1893).

Oggigiorno si preferisce usare la suddivisione di Rafael de Nò (1934), secondo la quale sono presenti tre campi: CA3, CA2 (nell'insieme sovrapponibili alla regione inferiore) e CA1 (che coincide con la regione superiore).

Il campo CA2 è da sempre oggetto di dibattito in quanto è molto piccolo comparato a CA3 e CA1 e mostra caratteristiche intermedie tra le due zone che lo delimitano. Infatti ha cellule di grandi dimensioni simili a quelle presenti in CA3 ma, come CA1, non è innervato dalle fibre muschiate.

Rafael de Nò definì anche un campo CA4, che in seguito fu identificato da Theodor Blackstad (1956) e successivamente da David Amaral (1978) come uno degli strati (in particolare lo strato polimorfo) del giro dentato.

Il subicolo è in continuazione con il campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto; il confine tra le due regioni si ha nel punto di terminazione delle collaterali di Schaffer provenienti dal campo CA3.

A questo livello nei Roditori si assiste a una differente disposizione delle cellule all'interno dello strato piramidale: infatti la struttura del subicolo resta trilaminare (come l'ippocampo propriamente detto con cui è in continuazione), ma i neuroni piramidali sono meno compatti rispetto al campo CA1.

## **1.2. ORGANIZZAZIONE TRIDIMENSIONALE DELLA FORMAZIONE IPPOCAMPALE DI RATTO**

La formazione ippocampale presenta la medesima neuroanatomia tra Roditori e Primati, anche se le sue dimensioni variano notevolmente: comparata a quella di ratto, è 10 volte più grande nella scimmia e 100 volte maggiore nell'uomo.

La citoarchitettura e le connessioni neuronali intrinseche alla formazione ippocampale mostrano delle analogie tra le diverse specie, anche se sono presenti alcune peculiarità.

Esempi di differenze citoarchitettoniche si hanno a livello di campo CA1. I neuroni piramidali di CA1 nel ratto costituiscono uno strato compatto, costituito da 5 strati cellulari; nella uomo invece lo strato dei neuroni piramidali è formato fino a 30 strati di cellule che presentano una certa eterogeneità fra loro.

Le connessioni commissurali del giro dentato sono connessioni intrinseche alla formazione ippocampale che variano notevolmente tra Roditori e Primati. Infatti nel ratto sono presenti e importanti, in quanto veicolano 1/6 degli input diretti al giro dentato (Raisman, 1965; Gottlieb e Cowan, 1973), mentre nella scimmia e nell'uomo sono praticamente assenti (Amaral et al., 1984).

In letteratura sono riportate molte altre differenze interspecifiche non solo citoarchitettoniche e di connessione neuronale, ma anche riguardanti il corredo neurochimico.

Nel Ratto la posizione tridimensionale della formazione ippocampale all'interno dell'encefalo è piuttosto complessa (Figura 1). Approssimativamente ha forma allungata, con l'asse maggiore a forma di C, che si estende a partire dai nuclei settali (rostro-dorsalmente) sino all'inizio del lobo temporale (caudo-ventralmente).

L'asse maggiore della formazione ippocampale è riferita come asse setto-temporale (con il polo settale rivolto rostralmente e quello temporale caudalmente); l'asse minore invece come asse trasversale.

Una caratteristica interessante e non facilmente intuibile è che le differenti regioni che costituiscono la formazione ippocampale variano la loro disposizione lungo l'asse setto-temporale.

Ai livelli più settali sono presenti unicamente giro dentato ed campi CA3, CA2 e CA1 dell'ippocampo propriamente detto; procedendo in direzione caudale, verso il polo temporale, compare il subicolo.

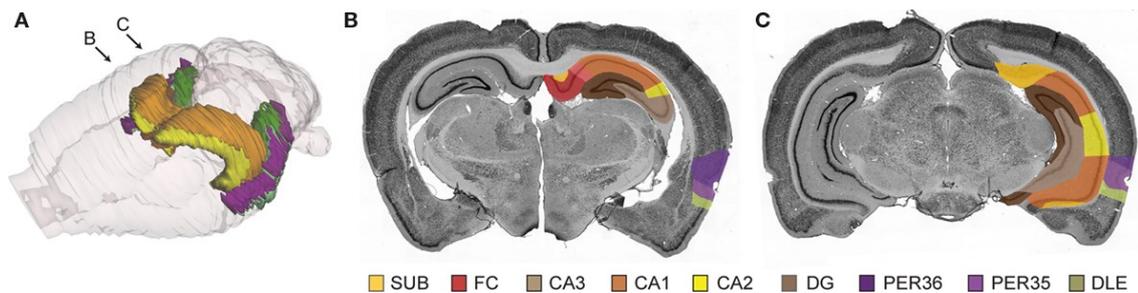


Figura 1. Organizzazione tridimensionale (A) e regioni della formazione ippocampale (B e C). In A le frecce indicano i punti in corrispondenza dei quali sono state condotte le sezioni indicate in B e C (da Kjonigsen et al., 2011).

### 1.3. CIRCUITO IPOCAMPALE

La formazione ippocampale comprende delle strutture (giro dentato, ippocampo propriamente detto e subicolo) che fanno parte di un unico sistema di connessione di tipo unidirezionale (Ramon y Cajal, 1893).

Inizialmente si parlava di circuito trisinaptico, enfatizzando le connessioni tra corteccia entorinale e giro dentato (via perforante), giro dentato e campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto (*mossy fiber* o fibre muschiate), campo CA3 e campo CA1 (via delle collaterali di Schaffer) (Figura 2).

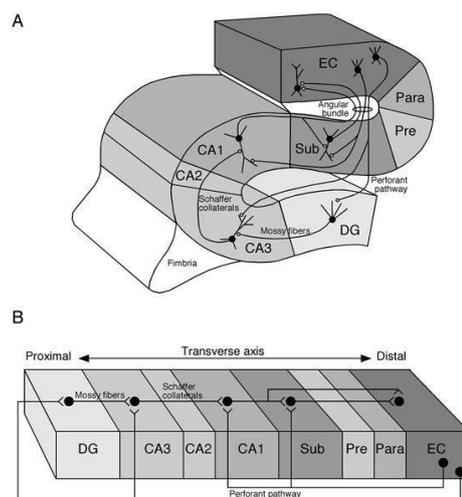


Figura 2. Rappresentazione schematica delle connessioni intraippocampali (Amaral et al., 2014: The Hippocampus Book)

Successivamente, con la scoperta di importanti proiezioni dal campo CA1 al subicolo e alla corteccia entorinale, e dalla corteccia entorinale alla neocorteccia, fu chiaro che il circuito trisinaptico era parte di un sistema funzionale più ampio che comprendeva altre strutture.

Oggi giorno la corteccia entorinale è considerata la prima tappa del circuito ippocampale in quanto la maggior parte degli output neocorticali diretti alla formazione ippocampale passa da tale struttura. Le proiezioni unidirezionali tra la corteccia entorinale e il giro dentato costituiscono la via perforante.

Gli assoni delle cellule principali del giro dentato, le cellule dei granuli, costituiscono le fibre muschiate che raggiungono i neuroni piramidali del campo CA3.

A loro volta le cellule piramidali di CA3 proiettano ai neuroni piramidali del campo CA1. Gli assoni che collegano in modo unidirezionale i campi CA3 e CA1 formano le collaterali di Schaffer.

I neuroni piramidali del campo CA1 proiettano in modo unidirezionale al subicolo, rappresentando così la sua principale fonte di input eccitatori, e alla corteccia entorinale.

Il subicolo proietta principalmente alla corteccia entorinale, nonostante fornisca input eccitatori anche al presubicolo e al parasubicolo.

E' interessante notare come il circuito ippocampale inizi negli strati superficiali della corteccia entorinale e termini nei suoi strati profondi con le proiezioni dell'ippocampo propriamente detto (in particolare del campo CA1) e del subicolo.

Il flusso di informazioni tipicamente unidirezionale, insieme alla particolare disposizione tridimensionale delle fibre di connessione (network neuronali), rende unica la neuroanatomia della formazione ippocampale.

La formazione ippocampale, infatti, è una delle poche strutture encefaliche che riceve informazioni sensoriali ampiamente processate di

tipo multimodale dalla neocorteccia. La presenza di numerosi network neuronali rende possibile l'ulteriore comparazione e/o integrazione degli input neocorticali.

## **1.4. PRINCIPALI FASCI DELLA FORMAZIONE IPOCAMPALE DI RATTO**

### 1.4.1. Fascio angolare

Il fascio angolare connette la corteccia entorinale con le altre regioni della formazione ippocampale.

Le fibre che originano dalla corteccia entorinale raggiungono il giro dentato, l'ippocampo propriamente detto e il subicolo tramite il fascio angolare; tale fascio percorre la formazione ippocampale lungo tutto l'asse setto-temporale, veicolando gli input corticali alle regioni della formazione ippocampale.

Inoltre il fascio angolare contiene fibre commissurali (provenienti dalla corteccia entorinale e dal presubicolo controlaterali) e fibre d'appartenenza corticale e sottocorticale correlate con la corteccia entorinale.

Gli input neocorticali, tramite l'interposizione della corteccia entorinale, raggiungono il giro dentato e l'ippocampo propriamente detto tramite la via perforante e l'alveo, struttura facente parte del sistema fimbria-fornice.

In particolare, a livello temporale gli input corticali raggiungono il campo CA1 tramite la via perforante, mentre spostandosi verso l'asse setto-temporale l'alveo acquista un'importanza sempre maggiore (Deller et al., 1996).

#### 1.4.2. Fimbria-fornice

Il sistema fimbria-fornice rappresenta il principale collegamento tra formazione ippocampale e strutture subcorticali quali ipotalamo, tronco encefalico e nuclei della base (Figura 3) (Daitz e Powell, 1954; Powell et al, 1957).

La superficie ventricolare dell'ippocampo è coperta da un sottile fascio di fibre afferenti ed efferenti, per lo più mieliniche, che viene nominato alveo. L'alveo è costituito sia da fibre estrinseche alla formazione ippocampale, sia da fibre facenti parte del network neuronale intrinseco a tale struttura (ad esempio le proiezioni corteccia entorinale-CA1, CA1-subicolo e CA1-corteccia entorinale).

Alcune fibre dell'alveo originano dai neuroni piramidali dell'ippocampo propriamente detto e dal subicolo e terminano su strutture subcorticali (Meybach e Siegel, 1975).

Le fibre che costituiscono l'alveo si raggruppano e formano un fascio sempre più voluminoso, la fimbria, che diviene progressivamente più spessa procedendo in direzione settale. Questo avviene poiché, procedendo in direzione settale, al fascio si aggiungono assoni di ulteriori neuroni piramidali.

Nel ratto la fimbria è costituita da circa 900.000 assoni che non sono disposti casualmente, ma seguono una precisa topografia (Wyss et al., 1980): gli assoni situati medialmente originano dall'ippocampo propriamente detto più settale; quelli posti lateralmente dall'ippocampo propriamente detto più temporale; le fibre di provenienza subicolare, invece, sono negli strati più profondi della fimbria, ventralmente agli assoni ippocampali.

Il fornice è la continuazione della fimbria: esso forma un fascio appiattito ventralmente al corpo calloso e veicola anch'esso output diretti

alle strutture subcorticali provenienti dall'ippocampo propriamente detto e dal subicolo.

A livello di commessura anteriore, il fornice si divide in una parte precommessurale (diretta anteriormente) ed in una postcommessurale (diretta caudalmente al diencefalo).

Le fibre del fornice precommessurale originano principalmente dalle cellule piramidali dell'ippocampo propriamente detto e si portano ai nuclei del setto e al nucleo *accumbens*.

Le fibre del fornice postcommessurale originano dal subicolo e terminano a livello dei corpi mamillari dell'ipotalamo posteriore. Il fornice postcommessurale stacca due fasci: il tratto cortico-ipotalamico mediale, che si porta a numerose aree ipotalamiche anteriori; e il tratto subicolo-talamico diretto ai nuclei talamici anteriori (Swanson e Cowan, 1975; Canteras e Swanson, 1992).

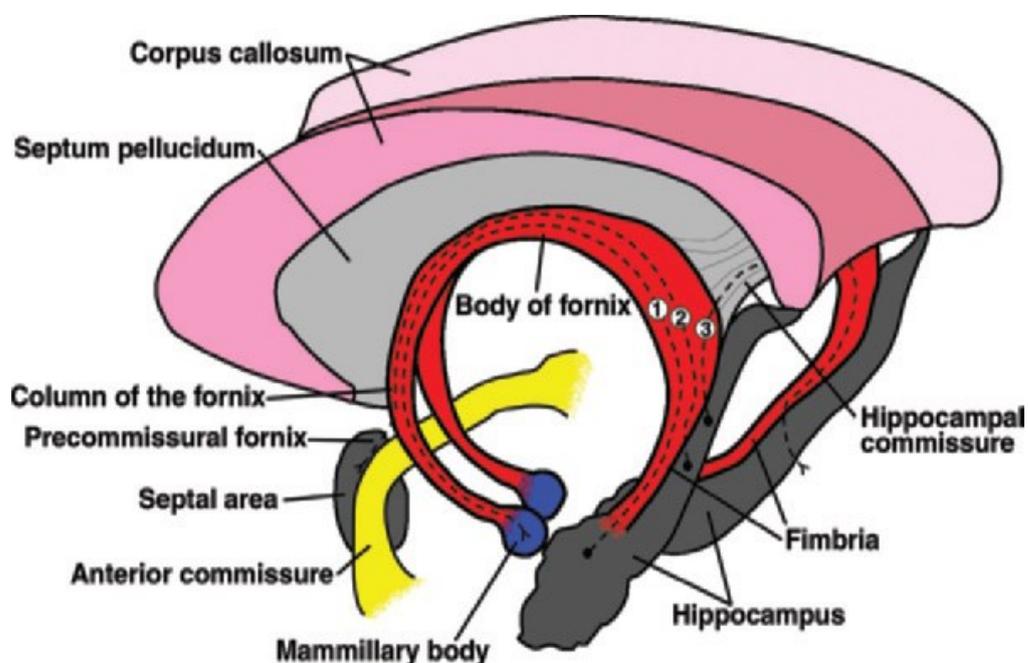


Figura 3. Fasci della formazione ippocampale (Modificato da Nolte, 1993)

La fimbria e il fornice, oltre a veicolare informazioni provenienti dall'ippocampo propriamente detto e dal subicolo, contengono anche input subcorticali diretti alla formazione ippocampale (ad esempio dai nuclei del setto, dal *locus coeruleus* e dai nuclei del rafe).

Altre proiezioni subcorticali raggiungono la formazione ippocampale tramite altri sistemi di fibre: il talamo anteriore proietta al presubicolo tramite le radiazioni talamiche; le efferenze dell'amigdala, invece, raggiungono la formazione ippocampale attraverso la capsula esterna.

#### 1.4.3. Commesure ippocampali

Un terzo sistema di fibre associato alla formazione ippocampale è il sistema commessurale (Figura 3) (Blackstad, 1956; Raisman et al., 1965; Laatsch e Cowan, 1967; Laurberg, 1979) che mette in comunicazione le formazioni ippocampali dei due emisferi cerebrali.

Nel ratto sono presenti sia la commessura ippocampale dorsale che la commessura ippocampale ventrale.

La commessura ippocampale ventrale si trova caudalmente all'area settale, dorsocaudale rispetto alla commessura anteriore. Le fibre presenti sono principalmente di tipo commessurale e dirette quindi alla formazione ippocampale controlaterale.

La commessura ippocampale dorsale attraversa la linea mediana dell'encefalo rostralmente allo splenio del corpo calloso e veicola informazioni dirette o provenienti dal presubicolo e dalla corteccia entorinale. È la via principale secondo la quale il presubicolo invia efferenze alla corteccia entorinale controlaterale.

## 1.5. CARATTERISTICHE DELLA FORMAZIONE IPOCAMPALE DEI PRIMATI

La formazione ippocampale nei Primati (*Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta* ed Uomo) (figura 4) non ha una forma a C o V come nel ratto, ma mostra un asse maggiore pressoché orizzontale. Per tale motivo non viene usato il termine asse setto-temporale, ma asse rostro-caudale.

La differente posizione della formazione ippocampale nell'encefalo dei Primati è dovuta soprattutto allo sviluppo delle aree associative corticali dei lobi frontali e temporali; lo sviluppo di tali aree relega la formazione ippocampale quasi interamente all'interno del lobo temporale.

Fascio angolare, complesso fimbria-fornice e commessure ippocampali sono fondamentalmente simili a quelle del ratto, mostrando solo lievi differenze.

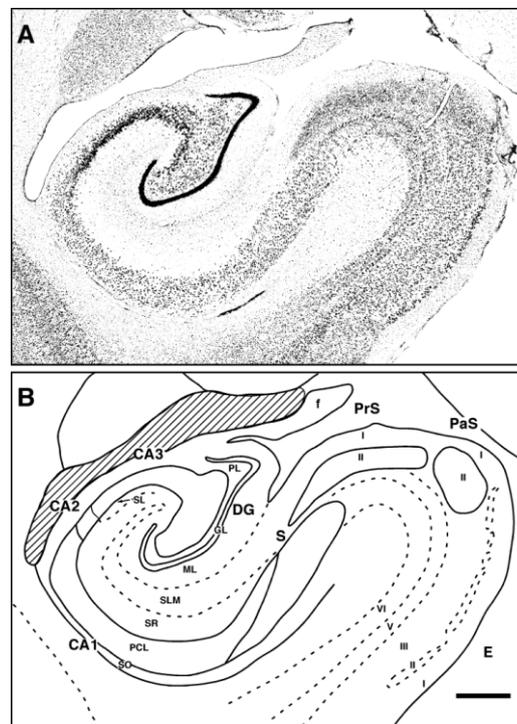


Figura 4. Formazione ippocampale di Scimmia DG: giro dentato; S: subicolo; PrS: presubicolo; PaS: parasubicolo; f: fimbria; PL: strato polimorfo; GL: strato dei granuli; ML: strato molecolare; SLM: strato lacunoso-molecolare; SR: strato radiato; PCL: strato delle cellule piramidali; SO: strato oriens (da Jongen-Rêlo et al., 1999). Bar = 1 mm

## 2. GIRO DENTATO

### 2.1. ORGANIZZAZIONE CITOARCHITETTONICA

Il giro dentato comprende tre strati: strato molecolare (adiacente alla fessura ippocampale), strato dei granuli e strato polimorfo. I primi due strati, anche chiamati fascia dentata, formano una struttura a forma di U o V (a seconda del livello setto-temporale) che accoglie tra le due branche lo strato polimorfo.

#### 2.1.1. Strato dei granuli

La porzione dello strato delle cellule dei granuli adiacente al campo CA1 è la lamina soprapiramidale, mentre la porzione opposta lamina infrapiramidale. L'area di unione tra le due lamine è chiamata cresta.

All'interno di questo strato troviamo cellule dei granuli, neuroni piramidali basket e altri tipi di interneuroni subgranulari.

##### 2.1.1.1. Cellula dei granuli

Le cellule dei granuli sono le cellule principali in quanto i loro assoni principali (chiamati fibre muschiate o *mossy fiber*) sono le uniche fibre efferenti a lasciare il giro dentato per andare ad innervare l'ippocampo propriamente detto (in particolare i dendriti prossimali dei neuroni piramidali di CA3).

Il loro nome deriva dalla forma del corpo cellulare, ellittico e relativamente piccolo (8-12  $\mu\text{m}$  diametro), in stretto rapporto con il soma

delle cellule circostanti, al punto da determinare, per la maggior parte di esse, la mancanza della guaina gliale interposta.

Nel ratto lo strato dei granuli è formato da 4-8 strati di cellule sovrapposte tra loro (Seress e Pokorny, 1981; Claiborne et al., 1986, 1990; Seress, 1988). Tali cellule presentano un caratteristico albero dendritico provvisto di spine a forma di cono, ramificato verso la porzione superficiale dello strato molecolare (Figura 5) (Claiborne *et al.*, 1990; Desmond e Levy, 1985).

Nella lamina soprapiramidale l'albero dendritico delle cellule dei granuli tende ad essere medialmente più esteso rispetto a quello della lamina infrapiramidale (3500  $\mu\text{m}$  vs. 2800  $\mu\text{m}$ ). Nella lamina soprapiramidale sono presenti in media 1.6 spine dendritiche/ $\mu\text{m}$ , mentre nella infrapiramidale 1.3 spine/ $\mu\text{m}$ . Combinando tali misurazioni si ottiene che il numero di spine totali è di 5600 spine/cellula nella lamina soprapiramidale e di 3640/cellula nell'infrapiramidale (Desmond e Levy, 1985).

Il numero totale delle cellule dei granuli in un giro dentato di ratto è circa  $1.2 \times 10^6$  (West et al., 1991; Rapp e Gallagher, 1996). Nonostante tali cellule continuino a proliferare anche in vita adulta, studi stereologici hanno dimostrato che il numero di cellule non varia negli animali adulti (Rapp e Gallagher, 1996). Solo in giovani topi sottoposti a particolari condizioni ambientali, quali ambienti socialmente complessi, si osserva un giro dentato più sviluppato con un numero maggiore di granuli (Kempermann et al., 1997).

La densità cellulare e lo spessore dello strato delle cellule dei granuli risultano alquanto variabili lungo l'asse setto-temporale del giro dentato, con valori maggiori a livello settale piuttosto che temporale (Gaarskjaer, 1978a).

Al contrario, la densità delle cellule piramidali nel campo CA3 segue un gradiente opposto. Di conseguenza nel campo CA3 della formazione ippocampale a livello settale il rapporto tra le cellule dei granuli e le cellule piramidali è all'incirca 12:1, mentre nel polo temporale si inverte in 2:3.

Essendo il campo CA3 la zona di principale terminazione degli assoni delle cellule dei granuli, l'implicazione funzionale di tali rapporti numerici è un minor contatto tra queste due importanti aree a livello settale piuttosto che temporale.

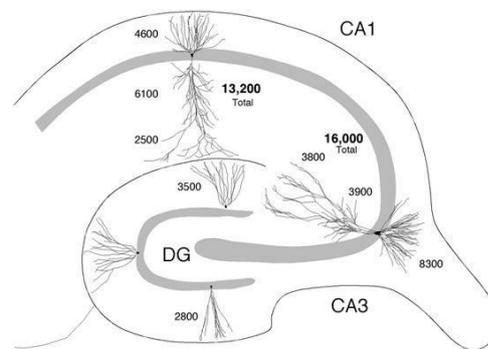


Figura 5. Rappresentazione schematica delle arborizzazioni dendritiche delle cellule dei granuli nel giro dentato e delle cellule piramidali nella formazione ippocampale di ratto (Amaral e Lavenex, 2007)

Oltre questi neuroni, le uniche altre cellule che inviano proiezioni al di fuori del giro dentato sono le cellule muschiate dello strato polimorfo, i cui assoni proiettano al giro dentato controlaterale.

#### 2.1.1.2. Cellula piramidale basket

Le cellule basket (o a canestro) si trovano nello strato più profondo dei granuli, al confine con lo strato polimorfo. Il loro nome deriva dal fatto che con i loro assoni formano dei plessi intorno alle cellule dei granuli (plessi perigranulari o a canestro) con le quali contraggono sinapsi a livello di corpo cellulare e dendriti prossimali (Figura 6).

Le cellule basket hanno un soma piramidale con un diametro di 25-35  $\mu\text{m}$ , un unico dendrite apicale privo di spine diretto verso lo strato molecolare e numerosi dendriti basali che si estendono diramandosi nello strato polimorfo (Ramon y Cajal, 1893, Seress e Pokorny, 1981; Ribak e Seress, 1983; Seress e Ribak, 1983, 1990a,b).

La maggior parte di questi interneuroni è di natura inibitoria, mostrandosi immunoreattiva per l'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA) (Ribak et al., 1978; Ribak e Seress, 1983).

Il numero delle cellule basket non è costante lungo l'asse setto-temporale del giro dentato (Seress e Pokorny, 1981). A livello settale il rapporto basket/cellule dei granuli è di 1:100 nella lamina soprapiramidale e di 1:80 a livello di lamina infrapiramidale. A livello temporale, invece, è rispettivamente 1:150 e 1:300.

#### 2.1.1.3. Altri interneuroni

Nel ratto a livello subgranulare, oltre alle cellule basket si trovano altri neuroni morfologicamente eterogenei sia per la forma del soma sia per le differenti configurazioni dendritiche e assonali (Figura 6) (Amaral, 1978).

Alcuni di essi sono multipolari, altri fusiformi, ed entrambi hanno molteplici dendriti privi di spine che si portano all'interno degli strati polimorfo e molecolare.

Queste cellule sono accomunate da fini caratteristiche strutturali quali un nucleo invaginato, abbondante citoplasma perinucleare con evidenti corpi di Nissl e bastoncelli intranucleari (Ribak e Seress, 1983).

I loro assoni formano sinapsi con i corpi cellulari, i dendriti prossimali e occasionalmente gli assoni delle cellule dei granuli, contribuendo alla formazione del plesso perigranulare.

Molte di questi interneuroni mostrano immunoreattività per il GABA, confermando la loro natura inibitoria, e co-localizzano diversi tipi di sostanze neuro-attive (somatostatina, peptide vasoattivo intestinale, calretinina e neuropeptide Y) (Freund e Buzsaki, 1996).

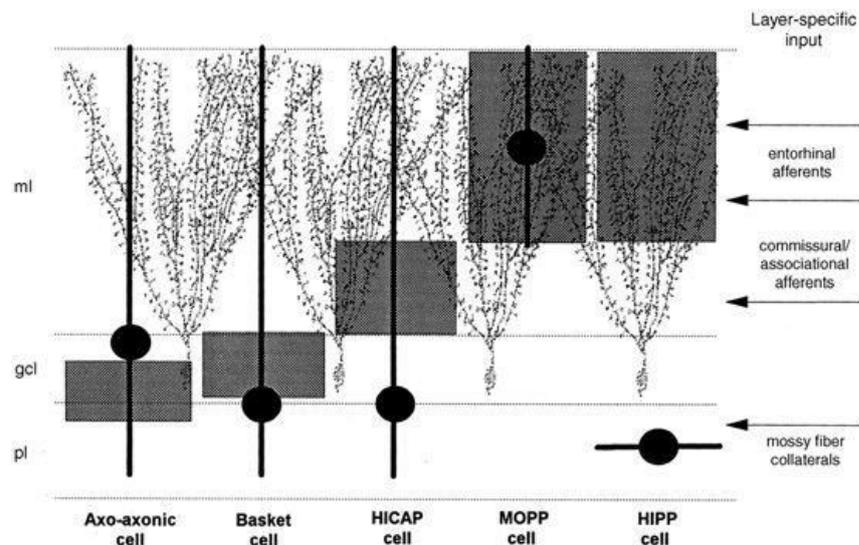


Figura 6. Classificazione morfologica degli interneuroni del giro dentato di ratto. I cerchi neri indicano i corpi cellulari; le linee spesse l'orientamento principale e la distribuzione laminare dei dendriti. Le cellule dei granuli sono illustrate in secondo piano. E' indicata anche la distribuzione laminare dei diversi input (Modificato da Freund e Buzsaki, 1996).

### 2.1.2. Strato molecolare

Nello strato molecolare troviamo i dendriti delle cellule dei granuli, dei neuroni basket e degli altri interneuroni sub granulari; inoltre sono presenti arborizzazioni assoniche terminali provenienti dalla corteccia entorinale e da altre strutture (Figura 6).

In questo strato sono presenti tipi cellulari ben distinti: le MOPPs (*molecular layer perforant path-associated cells*), le cellule asso-asoniche e le cellule IS (*interneuron-specific*). Queste ultime saranno descritte nel capitolo successivo ("Ippocampo propriamente detto").

#### 2.1.2.1. Cellule MOPP

Le cellule MOPP hanno un corpo cellulare multipolare o triangolare situato negli strati più profondi dello strato molecolare, verso la fessura ippocampale (Figura 6).

Gli assoni di queste cellule, così come i loro dendriti privi di spine, restano all'interno dello strato molecolare e formano un plesso assonico confinato ai 2/3 più esterni del medesimo (Han et al., 1993).

I loro terminali assonici contraggono sinapsi simmetriche e inibitorie con i dendriti delle cellule dei granuli (Halasy e Somogyi, 1993b).

#### 2.1.2.2. Cellule a candelabro

Il secondo tipo di neurone presente nello strato molecolare è simile alle cellule a candelabro segnalate originariamente a livello di neocorteccia (Soriano e Frotscher, 1989; Soriano et al. 1990; Han et al., 1993 Buhl et al., 1994).

Le cellule a candelabro (o asso-assoniche) si trovano al confine con lo strato dei granuli (Figura 6). Il nome deriva dal fatto che i loro assoni si diramano più volte (ognuna di queste cellule può innervare fino a 1000 cellule dei granuli) e terminano esclusivamente sul tratto iniziale dell'assone delle cellule dei granuli dove formano sinapsi simmetriche e inibitorie.

Dato che le cellule a candelabro sono immunoreattive per GABA, GAD (acido glutammico decarbossilasi) e parvalbumina, è probabile che rappresentino un ulteriore meccanismo di controllo inibitorio dell'output delle cellule dei granuli.

Le afferenze delle cellule a candelabro sono ancora sconosciute; probabilmente i loro dendriti, che rimangono per lo più confinati nello strato molecolare, ricevono input dalla corteccia entorinale (via perforante).

### 2.1.3. Strato polimorfo

Lo strato polimorfo presenta numerosi tipi cellulari tra i quali ricordiamo le cellule muschiate, le HIPPs (*hilar perforant path-associated cells*) e le HICAP (*hilar commissural-associational pathway-related cells*).

#### 2.1.3.1. Cellule muschiate

Il tipo cellulare più frequente e senza dubbio più particolare, è la cellula muschiata (*mossy cell*). Tale cellula mostra un soma di grandi dimensioni (25-35  $\mu\text{m}$ ) multipolare o triangolare, da cui prendono origine tre o più voluminosi dendriti che si estendono per lunghi tratti all'interno dello stesso strato (Amaral, 1978).

Ogni dendrite principale si biforca una o due volte per poi staccare pochi rami collaterali. Occasionalmente le più fini diramazioni dendritiche possono attraversare lo strato dei granuli e arrivare allo strato molecolare (Soltész e Mody, 1994; Scharfman, 1995). I dendriti delle cellule muschiate virtualmente non oltrepassano mai i confini dello strato polimorfo, non sconfinando perciò nell'adiacente campo CA3.

Caratteristica peculiare delle cellule muschiate sono le “escrescenze spinose”, ampie e complesse spine a livello di dendriti prossimali che rappresentano il sito di terminazione delle fibre muschiate (Ribak *et al.*, 1985; Frotscher *et al.* 1991).

Sebbene le stesse escrescenze siano state riscontrate anche sui dendriti prossimali delle cellule piramidali presenti nel campo CA3, la loro densità è significativamente maggiore a livello di cellule muschiate.

I dendriti distali delle cellule muschiate presentano tipiche spine peduncolate meno dense rispetto a quelle delle cellule piramidali dell'ippocampo propriamente detto.

Le cellule muschiate sono immunoreattive per il glutammato (Soriano e Frotscher, 1994; Scharfman, 1995b); i loro assoni proiettano al terzo prossimale dello strato molecolare del giro dentato ipsilaterale e controlaterale, creando sinapsi simmetriche sui dendriti delle cellule dei granuli (Frotscher e Zimmer, 1983a,b;Frotscher et al., 1984; Ribak et al., 1985; Buckmaster et al., 1996).

Per tale motivo le cellule muschiate sembrano essere la maggior fonte di fibre associative/commissurali di tipo eccitatorio al giro dentato (Amaral, 1978).

#### 2.1.3.2. Cellule HIPP e HICAP

All'interno dello strato polimorfo, oltre alle cellule muschiate, si trovano interneuroni che contraggono sinapsi inibitorie sui dendriti delle cellule dei granuli (Figura 6) (Halasy e Somogyi, 1993b; Han et al., 1993; Sik et al. 1997).

Un tipo è rappresentato dalle cellule HIPP (*hilar perforant path-associated cell*), i cui dendriti corrono pressoché parallelamente allo strato dei granuli e possono estendersi per quasi l'intera lunghezza di questo strato (Amaral, 1978).

La particolarità di questi neuroni risiede nelle numerose spine sul soma e sui dendriti e nei loro plessi assonici che si sviluppano fino a 3.5 mm lungo l'asse setto-temporale del giro dentato (nel ratto la lunghezza di tale struttura è circa 10 mm) (Buckmaster e Schwartzkroin, 1995a; Sik et al., 1997).

Gli assoni delle cellule HIPP attraversano lo strato dei granuli e arrivano alla parte più esterna dello strato molecolare (*perforant path zone*) dove contraggono sinapsi simmetriche e inibitorie sui dendriti dei granuli (Halasy e Somogy, 1993b; Han et al., 1993).

In questo modo le cellule HIPP sono responsabile di un feedback inibitorio sulle cellule principali del giro dentato, contraendo sinapsi sulle diramazioni dendritiche delle stesse (Halasy e Somogy, 1993b; Han et al., 1993; Sik et al. 1997).

Nello strato polimorfo sono presenti anche le cellule HICAP (*hilar commissural-associational pathway-related cells*), neuroni dal soma triangolare o multipolare con dendriti sottili e privi di spine e assoni che innervano la parte più interna dello strato molecolare (Han et al., 1993; Buckmaster e Schwartzkroin, 1995b).

Anche queste cellule hanno funzione inibitoria sulle cellule dei granuli (Han et al., 1993; Sik et al. 1997).

## **2.2. CONNESSIONI INTRINSECHE**

### **2.2.1. Proiezioni dalle cellule dei granuli allo strato polimorfo**

Le cellule dei granuli danno origine a caratteristici assoni amielinici definite fibre muschiate da Ramòn y Cajal. Ognuna delle fibre muschiate principali, dal diametro variabile tra 0.2 e 0.5  $\mu\text{m}$ , stacca circa sette collaterali più sottili all'interno dello strato polimorfo prima di fare ingresso nel campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto (Claiborne *et al.*, 1986).

All'interno dello strato polimorfo le collaterali delle fibre muschiate costituiscono due tipi di varicosità sinaptiche. Esistono circa 160 piccole varicosità (approssimativamente 2  $\mu\text{m}$ ) distribuite entro tutto il plesso

assonico collaterale di una singola cellula dei granuli, le quali prendono contatto con spine e colonne dendritiche appartenenti a neuroni dello strato polimorfo (Claiborne *et al.*, 1986).

Nella porzione terminale di ciascun ramo collaterale è solitamente presente anche una singola varicosità di dimensioni maggiori (3-5  $\mu\text{m}$ ) e di forma irregolare, simile alle terminazioni delle fibre muschiate nel campo CA3.

Le terminazioni delle fibre muschiate all'interno dello strato polimorfo stabiliscono contatti con i dendriti prossimali delle cellule muschiate e con i dendriti basali delle cellule basket piramidali ed altre cellule non ben identificate (Ribak e Seress, 1983; Ribak *et al.*, 1985; Scharfman *et al.*, 1990).

### 2.2.2. Proiezioni dalle cellule basket e da altri interneuroni GABAergici

Come descritto in precedenza, esiste un'ampia varietà di cellule basket site nella porzione più profonda dello strato dei granuli. Sembra che tali cellule contribuiscano alla formazione del fitto plesso terminale posto all'interno dello strato stesso. Le terminazioni di questo plesso basket sono GABAergiche, e formano contatti simmetrici, presumibilmente inibitori, soprattutto a livello di pirenoforo e tronchi dendritici apicali delle cellule dei granuli (Kosaka *et al.*, 1984). Vi sono prove sempre più evidenti che questi neuroni GABAergici della porzione più profonda dello strato dei granuli siano a loro volta innervati da terminazioni del medesimo tipo (Misgeld e Frotscher, 1986). Dato lo scarso numero di cellule basket rispetto a quelle dei granuli, viene da chiedersi quanto estesa sia l'influenza di ogni singola cellula basket. Analisi dei plessi assonici di singole cellule basket condotte mediante colorazione di Golgi ne evidenziano un'estensione media di circa 400  $\mu\text{m}$  lungo l'asse trasversale, e di circa 1.1

mm lungo quello setto-temporale. E' pertanto possibile immaginare che una singola cellula basket sia in grado di influenzare un ampio numero di cellule dei granuli.

Un secondo input inibitorio alle cellule dei granuli proviene dalle cellule asso-assoniche (anche denominate a candelabro) collocate nello strato molecolare, le quali instaurano contatti sinaptici simmetrici esclusivamente con il segmento assonico iniziale delle cellule dei granuli (Kosaka, 1983b; Soriano e Frotscher, 1989; Han *et al.*, 1993).

Un'altra proiezione intrinseca del giro dentato fu scoperta quando, mediante anticorpi diretti contro il peptide somatostatina, fu messa in luce una popolazione di neuroni immunopositivi sparsi lungo tutto lo strato polimorfo (Bakst *et al.*, 1986; Morrison *et al.*, 1982). Tali cellule costituivano un denso plesso di fibre e terminazioni nei due terzi esterni dello strato molecolare. E' chiaro che le cellule somatostatina-positive dello strato polimorfo, che esprimono anche il GABA, siano la principale fonte di fibre e terminazioni dello strato molecolare. Tale sistema di fibre, che prende contatto con la porzione distale dei dendriti delle cellule dei granuli, costituisce un terzo meccanismo di controllo inibitorio sull'attività di queste cellule (Halasy e Somogyi, 1993a,b; Bakst *et al.*, 1986).

### 2.2.3. Proiezioni commessurali

Il terzo più interno dello strato molecolare riceve una proiezione che origina esclusivamente da cellule dello strato polimorfo. Poiché nel ratto essa origina da siti sia ipsi- che contro laterali, è stata chiamata proiezione commessurale/d'associazione (Blackstad, 1956; Swanson *et al.*, 1978; Laurberg, 1979; Laurberg e Sorensen, 1981).

La maggior parte delle terminazioni di questa via forma sinapsi asimmetriche, presumibilmente eccitatorie, a livello di spine dendritiche

delle cellule dei granuli (Kishi *et al.*, 1980; Laatsch e Cowan, 1967). La quasi totalità degli assoni che contribuiscono alla genesi di queste terminazioni sinaptiche originano dalle cellule muschiate dello strato polimorfo; ogni singola cellula musciata contribuisce sia alla proiezione associativa ipsilaterale che alla commissurale (Laurberg e Sorensen, 1981; Swanson *et al.*, 1981; Ribak *et al.*, 1985; Frotscher *et al.*, 1991). Il fatto che le cellule muschiate sono immunoreattive per il glutammato conferma la natura eccitatoria di tale proiezione (Amaral e Witter, 1995).

La proiezione commissurale/d'associazione mostra delle caratteristiche particolari. Innanzitutto la proiezione che origina da cellule muschiate poste a un determinato livello del giro dentato si distribuisce ampiamente sia in direzione settale che temporale rispetto al punto di origine. Inoltre sembra essere sostanzialmente meno intensa nel punto di emergenza rispetto ai livelli più distanti del giro dentato (Amaral e Witter, 1989).

Considerato che le cellule muschiate ricevono una densa innervazione dalle cellule dei granuli dello stesso livello (attraverso le fibre muscoidi collaterali dentro lo strato polimorfo), risulta chiaro che le cellule muschiate trasmettono l'output complessivo delle cellule dei granuli dal proprio livello setto-temporale a quelli più distanti del giro dentato.

Il significato funzionale della distribuzione longitudinale della proiezione associativa non può prescindere dalla valutazione di un ulteriore aspetto. Oltre a prendere contatto con le spine dendritiche delle cellule dei granuli, le fibre di associazione sono inoltre connesse agli alberi dendritici delle cellule basket GABAergiche (Frotscher e Zimmer, 1983a,b; Seress e Ribak, 1984). Pertanto le proiezioni commissurali/d'associazione possono agire come via feed-forward sia eccitatoria che disinaptica inibitoria.

#### 2.2.4. Fibre muschiate

Come segnalato precedentemente, l'unica proiezione che abbandona il giro dentato è rappresentata dalle fibre muschiate, dirette al campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto (Blackstad et al., 1970; Gaarskjaer, 1978b; Swanson et al., 1978; Claiborne et al., 1986).

La distribuzione delle fibre muschiate rispetto ai neuroni piramidali di CA3 varia: a livello prossimale del campo CA3 (nella parte più prossima al giro dentato) alcune fibre decorrono superficialmente allo strato delle cellule piramidali (fascio soprapiramidale), altre si trovano in profondità (fascio infrapiramidale) e altre ancora viaggiano all'interno dello strato piramidale (fascio intrapiramidale).

A livello di parte distale del campo CA3, invece, il contingente di fibre infra- ed intrapiramidale scompare e permane solo il fascio soprapiramidale che termina in corrispondenza del limite tra CA3 e CA2. La mancanza di input provenienti dalle cellule dei granuli è una delle principali caratteristiche che permette di distinguere i neuroni piramidali di CA2 rispetto a quelli di CA3.

E' importante segnalare che, a prescindere dalla localizzazione delle cellule dei granuli di origine (lamina infrapiramidale, lamina soprapiramidale, cresta), le fibre muschiate si distribuiscono attraverso tutta l'estensione del campo CA3. Gli assoni delle cellule dei granuli poste nella lamina infrapiramidale e nella cresta del giro dentato tendono inizialmente a formare rispettivamente il fascio infra- ed intrapiramidale, per poi unirsi alle fibre che provengono dalla lamina soprapiramidale a formare il fascio soprapiramidale posto nello strato lucido (Claiborne et al., 1986).

Le fibre muschiate hanno varicosità presinaptiche molto sviluppati (3-5  $\mu\text{m}$  di diametro) chiamate espansioni sinaptiche (Amaral e Dent, 1981). Tali strutture entrano in contatto con un processo postinaptico

alquanto complesso posto sui dendriti dei neuroni piramidali del campo CA3, chiamato escrescenza spinosa.

Ogni espansione sinaptica può formare fino a 37 contatti sinaptici con un singolo dendrite di una cellula piramidale del campo CA3 (Chicurel e Harris, 1992). Tuttavia ogni fibra muschiata entra in contatto con relativamente poche cellule piramidali (Amaral *et al.*, 1990). Claiborne *et al.* (1986) hanno stimato che ogni fibra muschiata nel suo percorso all'interno dello strato lucido presenta circa 15 espansioni sinaptiche, e siccome ciascuna di queste prende rapporto con una singola cellula piramidale (o al massimo due dendriti di cellule piramidali adiacenti), ogni cellula dei granuli è in grado di influenzare presumibilmente solo 15-30 cellule piramidali. Al contrario, è stato stimato che ogni cellula piramidale riceve contatti da qualcosa come una cinquantina di cellule dei granuli.

Le fibre muschiate hanno una traiettoria relativamente lamellare, e sotto questo aspetto sono atipiche nell'ambito delle connessioni intrinseche ippocampali. Durante la maggior parte del loro percorso attraverso lo strato lucido, esse rimangono approssimativamente allo stesso livello setto-temporale delle cellule di origine (Claiborne *et al.*, 1986; Gaarskjaer, 1978a, 1978b; Swanson *et al.*, 1978).

In prossimità del confine tra i campi CA3 e CA2, comunque, le fibre muschiate compiono un'improvvisa svolta in direzione temporale e si estendono per 1mm o più verso il polo temporale. Il significato di questa componente delle fibre muschiate non è ancora stato a pieno compreso. A quanto sembra, la porzione più distale del campo CA3 potrebbe essere influenzata dalle cellule dei granuli da una più ampia estensione setto-temporale del giro dentato, così come accade per la porzione più prossimale. Comunque, non è mai stato dimostrato che le fibre muschiate dirette temporalmente prendano contatto con le cellule piramidali localizzate a livelli più temporali.

In maniera del tutto analoga alle altre connessioni intrinseche della regione ippocampale di ratto, il neurotrasmettitore principale delle fibre muschiate è il glutammato (Storm-Mathisen e Fonnum, 1972).

## **2.3. CONNESSIONI ESTRINSECHE**

### 2.3.1. Proiezioni della corteccia entorinale

Il giro dentato riceve la maggior parte degli input dalla corteccia entorinale attraverso la via perforante (Ramon y Cajal, 1893). Tali proiezioni originano dalle cellule del II e in misura minore dal V e VI strato (Steward e Scoville, 1976).

I terminali assonici corticali sono confinati ai due-terzi più superficiali dello strato molecolare del giro dentato, dove formano sinapsi asimmetriche con le spine dendritiche delle cellule dei granuli (Nafstad, 1967; Hjorth-Simonsen e Jeune, 1972); solo un piccolo contingente di fibre appartenenti alla via perforante entra in rapporto, sempre mediante sinapsi asimmetriche, con interneuroni GABA-immunoreattivi.

I neuroni del giro dentato i cui dendriti non raggiungono lo strato molecolare non ricevono afferenze corticali dirette (ad esempio le cellule muschiate; i cui dendriti sono confinati allo strato polimorfo).

### 2.3.2. Proiezioni settali

Le proiezioni più importanti e maggiormente studiate sono quelle provenienti dalla regione settale (Mosko et al., 1973; Swanson, 1978a; Baisden et al., 1984; Amaral e Kurz, 1985; Wainer et al., 1985; Nyakas et al., 1987; Gaykema *et al.*, 1990).

La proiezione settale origina da cellule del nucleo settale mediale e dal nucleo della bendelletta diagonale del Broca e viaggia verso la formazione ippocampale attraverso diverse vie quali la fimbria, il fornice dorsale, la stria sopracallosale e una via ventrale che attraversa e circonda il complesso amigdaloideo.

Le fibre settali innervano principalmente le cellule dello strato polimorfo, in particolare nella zona più prossima allo strato dei granuli (Lubke et al., 1997).

Diversi Autori (Amaral e Kurz, 1985; Wainer *et al.*, 1985) hanno riscontrato che il 30-50% delle cellule nel nucleo settale mediale ed il 50-75% di quelle del nucleo della bendelletta diagonale, che proiettano alla formazione ippocampale, sono colinergiche.

Tuttavia come per la proiezione serotoninergica, la maggior parte dei neuroni settali che proietta alla formazione ippocampale sembra essere non-colinergica (Amaral e Kurz, 1985; Wainer *et al.*, 1985).

All'interno del giro dentato le proiezioni settali colinergiche hanno target cellulari differenti rispetto alle proiezioni GABAergiche.

Le fibre GABAergiche terminano preferenzialmente su interneuroni esprimenti il GABA con i quali formano sinapsi simmetriche e presumibilmente inibitorie. Le proiezioni GABAergiche più importanti si portano allo strato polimorfo del giro dentato (Freund e Antal, 1988).

Molte delle cellule GABAergiche che ricevono proiezioni settali GABAergiche sono inoltre immunoreattive per colecistochinina, somatostatina o peptide intestinale vasoattivo (VIP), oppure esprimono proteine leganti il calcio quali calretinina, calbindina o parvalbumina (Acsády *et al.*, 1993; Freund e Antal, 1988).

Le proiezioni settali colinergiche al giro dentato terminano principalmente sulle spine dendritiche delle cellule dei granuli, nel terzo più profondo dello strato molecolare, formando sinapsi asimmetriche ed

eccitatorie. Solamente il 5-10% delle sinapsi colinergiche avviene a livello di interneuroni.

### 2.3.3. Proiezioni ipotalamiche

La maggior parte delle proiezioni ipotalamiche destinate al giro dentato origina da una popolazione di grandi cellule che sovrasta ed in parte circonda i nuclei mammillari, in una zona denominata area sopramammillare (Wyss et al., 1979; Dent et al., 1983; Haglund *et al.*, 1984; Vertes, 1993; Magloczky et al., 1994).

La proiezione sopramammillare si porta al terzo più profondo dello strato molecolare, e termina sui dendriti prossimali delle cellule dei granuli; i due-terzi superficiali dello strato molecolare e lo strato polimorfo ricevono solo un esiguo contingente di fibre.

Le proiezioni sopramammillari sembrano essere di natura eccitatoria poiché utilizzano il glutammato come neurotrasmettitore principale (Kiss et al., 2000).

La maggior parte dei neuroni glutamergici che proiettano al giro dentato colocalizzano per la calretinina; mentre solo alcuni per la sostanza P (Borhegyi e Leranth, 1997).

Oltre ai neuroni sopramammillari vi sono altre cellule, sparse in diversi nuclei ipotalamici (molti dei quali si trovano in posizione perifornicale o all'interno dell'area ipotalamica laterale), che proiettano al giro dentato.

Prese nell'insieme, tali cellule costituiscono un input ragguardevole alla regione ippocampale; tuttavia, la loro diffusione e l'assenza di un qualsivoglia marker biochimico distintivo hanno reso difficile lo studio di tali proiezioni.

#### 2.3.4. Proiezioni monoaminergiche del tronco encefalico

Il giro dentato riceve un'importante input noradrenergico dal *locus coeruleus* (Pickel et al., 1974; Swanson e Hartman, 1975; Loughlin et al., 1986). Le fibre noradrenergiche terminano principalmente nello strato polimorfo del giro dentato.

Le proiezioni dopaminergiche, invece, sono meno sviluppate e originano da cellule situate nell'area tegmentale ventrale (Swanson, 1983). Anch'esse si portano principalmente allo strato polimorfo.

Le proiezioni serotoninergiche originano dalle suddivisioni media e dorsale dei nuclei del rafe e terminano nella porzione sottogranulare dello strato polimorfo (Conrad *et al.*, 1974; Moore e Halaris, 1975; Köhler e Steinbusch, 1982; Vertes et al., 1999).

Le fibre serotoninergiche innervano principalmente interneuroni GABAergici, come ad esempio le cellule basket (Halasy et al., 1992). Inoltre proiettano a neuroni fusiformi che esprimono la calbindina.

Tuttavia come per la proiezione colinergica, la maggior parte delle cellule dei nuclei del rafe che proietta alla formazione ippocampale sembra essere non-serotoninergica (Köhler e Steinbusch, 1982; Montone *et al.*, 1988).

## **3. IPPOCAMPO PROPRIAMENTE DETTO**

### **3.1. ORGANIZZAZIONE CITOARCHITETTONICA**

L'ippocampo propriamente detto può essere diviso in tre campi: CA3, CA2 e CA1. I neuroni del campo CA3 sono di dimensioni maggiori rispetto a quelli di CA1. Oltre alla differente dimensione cellulare, vi sono, tra i campi CA3 e CA1, evidenti differenze di connessione. Le cellule piramidali del campo CA3 ricevono input dal giro dentato mediante le fibre muschiate, mentre ciò non avviene per le cellule piramidali del campo CA1.

Il campo CA2 è sempre stato fonte di controversie. Come definito in origine da Lorente de Nò, si tratta di una sottile stria cellulare interposta tra gli altri due campi, con cellule di grandi dimensioni, come nel campo CA3, ma priva di input da parte delle fibre muschiate, come nel campo CA1.

Sebbene la validità di tale divisione sia stata spesso discussa, la maggior parte dei dati disponibili indica l'esistenza di un sottile campo CA2 avente differenze sia di connessione che di funzione rispetto agli altri campi ippocampali.

Numerosi studi immunoistochimici hanno inoltre dimostrato che i neuroni del campo CA2 mostrano colorazione maggiore per l'acetilcolinesterasi e per la parvalbumina rispetto agli adiacenti campi CA3 e CA1 (Paxinos e Watson, 1980; Baimbridge e Miller, 1982; Sloviter *et al.*, 1991; Leranthe e Ribak, 1991).

L'ippocampo propriamente detto è costituito da quattro strati: strato oriens, strato dei neuroni piramidali, strato radiato e strato lacunosomolecolare.

### 3.1.1. Strato dei neuroni piramidali

Il tipo cellulare principale dell'ippocampo propriamente detto è rappresentato dalla cellula piramidale, la quale rappresenta la maggioranza dei neuroni presenti all'interno dello strato piramidale.

I neuroni piramidali presentano un albero dendritico basale, che si estende nello strato oriens, ed un dendrite apicale, che si arriva fino alla fessura ippocampale.

Accanto a questi tipi cellulari sono presenti anche interneuroni: cellule piramidali basket e cellule a candelabro.

#### 3.1.1.1. Neuroni piramidali dei campi CA3 e CA2

Le dimensioni dei dendriti e l'organizzazione delle cellule piramidali nel campo CA3 sono decisamente variabili. I neuroni più piccoli (20  $\mu\text{m}$  di diametro/area di 300  $\mu\text{m}^2$ ) si trovano nel limbo del giro dentato e presentano un'estensione dendritica totale di 8-10 mm.

I dendriti raramente raggiungono lo strato lacunoso-molecolare e, per tale motivo, gli input della corteccia entorinale sono pressoché assenti. Tuttavia questi i neuroni del limbo ricevono numerose afferenze dalle fibre muschiate, sia a livello di dendriti apicali che distali, e sono perciò ampiamente influenzati dalle cellule dei granuli.

Le cellule di dimensioni maggiori (30  $\mu\text{m}$  di diametro, area di 700  $\mu\text{m}^2$ ), invece, sono poste più distalmente e hanno un'estensione dendritica totale di 16-18 mm (Figura 7) (Ishizuka et al., 1995).

Le fibre muschiate formano sinapsi solo a livello di dendriti apicali e quindi l'influenza del giro dentato su questi neuroni è inferiore.

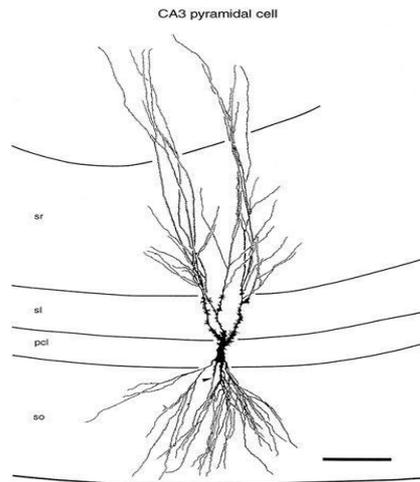


Figura 7. Disegno ottenuto mediante l'impiego della camera lucida di un neurone piramidale del campo CA3. L'assone è indicato dalla freccia. Notare le escrescenze spinose sui dendriti prossimali sulle quali le fibre muschiate contraggono sinapsi. Pcl: strato dei neuroni piramidali; sl: strato lucido; so: strato oriens; sr: strato radiato; hf: fessura ippocampale. Bar = 100  $\mu\text{m}$  (Modificato da Ishizuka et al., 1995).

### 3.1.1.2. Neuroni piramidali di CA1

A differenza dell'eterogeneità degli alberi dendritici dei neuroni nel campo CA3, le cellule in CA1 presentano dendriti simili tra loro (Pyapali et al., 1998), indipendentemente dalla posizione del soma.

Inoltre questi neuroni piramidali sono più piccoli (15  $\mu\text{m}$  di diametro, area di 193  $\mu\text{m}^2$ ) e hanno dendriti meno sviluppati (13.5 mm) se paragonati alle cellule del campo CA3 (Figure 8 e 9).

Questa omogeneità morfologica, tuttavia, non riflette un'analogia funzionale in quanto sono presenti forti differenze per quanto riguarda l'innervazione della corteccia entorinale lungo l'asse trasverso di CA1.

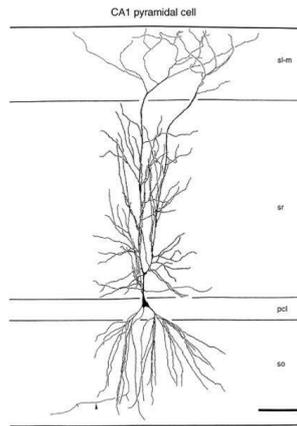


Figura 8. Disegno ottenuto mediante l'impiego della camera lucida di un neurone piramidale del campo CA1. L'assone è indicato dalla freccia. Pcl: strato dei neuroni piramidali; sl: strato lucido; so: strato oriens; sr: strato radiato; hf: fessura ippocampale. Bar = 100  $\mu$ m. (Modificato da Ishizuka et al., 1995).

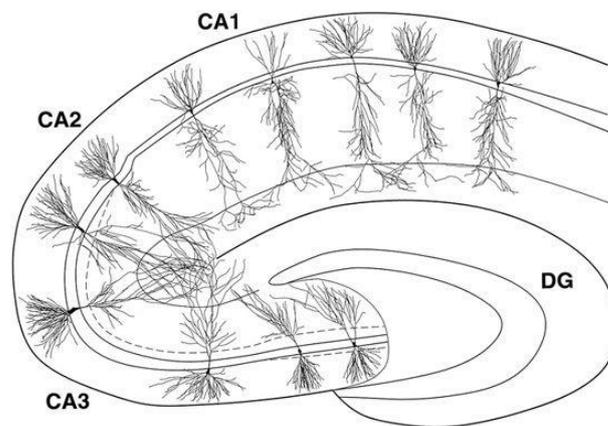


Figura 9. Rappresentazione schematica dell'organizzazione dei neuroni piramidali dei campi CA3, CA2 e CA1. La linea tratteggiata in CA3 segna la zona occupata dalle fibre muschiate infra- e soprapiramidali (Modificato da Ishizuka et al., 1995.)

### 3.1.1.3. Cellula piramidale basket

Le cellule piramidali basket hanno il soma all'interno o in prossimità dello strato piramidale e possiedono dendriti privi di spine che si portano a tutti gli strati dell'ippocampo propriamente detto (Figura 10).

I dendriti ricevono sinapsi simmetriche ed asimmetriche principalmente dai neuroni piramidali: ogni albero dendritico riceve approssimativamente 2000 input eccitatori.

Poiché un singolo neurone piramidale contrae sinapsi con un'unica cellula basket, il grado di convergenza di un neurone piramidale su un interneurone basket risulta essere enorme.

Ogni cellula basket piramidale presenta un assone con estensione trasversale di 900-1300  $\mu\text{m}$  che contrae sinapsi con i somi e i dendriti prossimali di numerosi neuroni piramidali: ogni interneurone esercita un controllo inibitorio su più di 1000 neuroni piramidali (Gulyàs et al., 1993a; Buhl et al., 1994a; Miles et al., 1996).

Oltre alle cellule basket piramidali, sono presenti interneuroni basket di differente morfologia: cellule fusiformi nello strato oriens e stellate/multipolari nello strato radiato (Gulyàs et al., 1993a; Freund e Buzsaki, 1996).

Studi di microscopia elettronica confermano che i target principali delle cellule basket sono i corpi cellulari e i dendriti prossimali dei neuroni piramidali (Seress e Ribak, 1985, 1990a,b; Gulyàs et al., 1993a; Buhl et al., 1994a; Miles et al., 1996).

#### 3.1.1.4. Cellule a candelabro

Le cellule a candelabro (o asso-assoniche) presenti nell'ippocampo propriamente detto sono simili a quelle presenti nel giro dentato.

Analogamente alle cellule basket piramidali, i loro somi si trovano all'interno o in prossimità dello strato piramidale e i dendriti si portano a tutti gli strati (Figura 10).

Gli assoni delle cellule a candelabro hanno un'estensione trasversale di circa 1 mm e originano collaterali che si portano alla parte prossimale degli assoni dei neuroni piramidali.

Ogni interneurone contrae sinapsi inibitoria con circa 1200 assoni di neuroni piramidali e ogni segmento iniziale assonico, quindi ogni neurone

piramidale, è innervato da 4-10 cellule a candelabro (Freund e Buzsaki, 1996).

Studi di microscopia elettronica confermano che le cellule a candelabro terminano selettivamente sul segmento iniziale dell'assone di neuroni piramidali non solo nel ratto, ma anche nel gatto e nella scimmia (Somogyi et al., 1983 a,b, 1985a; Gulyàs et al., 1993a; Buhl et al., 1994a,b).

### 3.1.2. Strato oriens

In profondità rispetto allo strato dei neuroni piramidale vi è uno strato relativamente povero di cellule, lo strato oriens. In questa zona si possono osservare i dendriti basali dei neuroni piramidali e diverse tipologie di interneuroni (Figura 10).

Lo strato oriens può essere definito come la regione infrapiramidale in cui sono localizzate alcune connessioni d'associazione CA3-CA3 e le collaterali di Schaffer CA3-CA1.

Ancora più in profondità rispetto allo strato oriens troviamo l'alveo.

### 3.1.3. Strato lucido

Lo strato lucido è una sottile zona priva di cellule presente solo nel campo CA3, occupata dalle fibre muschiate originante dal giro dentato. All'estremità distale di questo strato si rinviene un lieve ispessimento in cui le fibre muschiate ripiegano temporalmente, tracciando così il confine CA3/CA2.

#### 3.1.4. Strati radiato e lacunoso-molecolare

Superficiale allo strato lucido nel campo CA3, ed immediatamente sopra lo strato delle cellule piramidali nei campi CA2 e CA1, troviamo lo strato radiato.

Esso può essere definito come la regione soprapiramidale in cui sono localizzate le connessioni d'associazione CA3-CA3 e le collaterali di Schaffer CA3-CA1.

Lo strato lacunoso-molecolare rappresenta la porzione più superficiale dell'ippocampo propriamente detto e in esso viaggia e termina la via delle fibre perforanti, proveniente dalla corteccia entorinale (Figura 10).

In questo strato terminano anche afferenze provenienti da altre regioni, quali il nucleo reuniens del talamo mediano.

Nello strato oriens, nello strato radiato e nello strato lacunoso-molecolare sono presenti numerosi tipologie di neuroni GABAergici non-piramidali: cellule O-LM (*oriens lacunosum-molecolare associated cells*), cellule bistratificate, neuroni trilaminari e cellule IS (*interneuron-selective*) (Figura 10) (Ribak et al., 1978; Lacaille et al., 1987; Lacaille e Schwartzkroin, 1988a,b; Freund e Buzsaki, 1996).

##### 3.1.4.1. Cellule O-LM

Il soma degli interneuroni O-LM si trova nella zona dell'ippocampo propriamente detto in cui proiettano le collaterali ricorrenti dei neuroni piramidali; tale zona nel campo CA3 è rappresentata da tutti gli strati, eccetto lo strato lacunoso-molecolare, mentre in CA1 è costituita solamente dallo strato oriens (Figura 10).

Gli assoni delle cellule O-LM lasciano lo strato oriens (o lo strato in cui si trova il loro soma) e giunti a livello di strato lacunoso-molecolare costituiscono un denso plesso assonico (Gulyàs et al., 1993a,b; Mc Bain et al., 1994; Sik et al., 1995).

Tali assoni contraggono sinapsi simmetriche e inibitorie con la parte più distale dei dendriti apicali dei neuroni piramidali (Gulyàs et al., 1993a; Sik et al., 1995).

Dal momento che la maggior parte degli input eccitatori alle cellule O-LM sembra provenire dai neuroni piramidali, l'inibizione esercitata da questi interneuroni è un feedback disinaptico (Lacaille et al., 1987; Freund e Buzsaki, 1996).

#### 3.1.4.2. Cellule bistratificate e cellule trilaminari

Le cellule bistratificate presentano un corpo cellulare in prossimità dello strato piramidale. L'albero dendritico di ogni interneurone si porta a tutti gli strati, ma non raggiunge lo strato lacunoso-molecolare, a differenza delle cellule basket e a candelabro (Figura 10).

Il processo assonico, dopo aver staccato collaterali che si portano allo strato oriens, termina in un ampio plesso a livello di strato radiato.

Gli assoni contraggono sinapsi simmetriche sia su spine dendritiche che su dendriti prossimali dei neuroni piramidali (Buhl et al., 1994a; Sik et al., 1995; Freund e Buzsaki, 1996; Halasy et al., 1996; Miles et al., 1996).

Le cellule trilaminari orizzontali hanno il corpo cellulare al confine tra strato oriens ed alveo e mostrano dendriti orientati orizzontalmente che corrono all'interno dello strato oriens in direzione trasversale e setto-temporale (Figura 10) (Sik et al 1995).

Le cellule trilaminari radiali sono abbastanza simili alle bistratificate, anche se i loro dendriti apicali spesso raggiungono lo strato lacunosomolecolare.

Entrambe le tipologie di cellule trilaminari mostrano arborizzazioni assoniche che si portano ai diversi strati dell'ippocampo propriamente detto e contraggono sinapsi simmetriche a livello di alberi dendritici di neuroni non ben identificati (Sik et al 1995).

Nonostante gli input alle cellule bistratificate e alle cellule trilaminari radiali non siano del tutto chiari, è importante notare come i loro dendriti si trovino nella zona delle connessioni associative, in CA3, e nella zona delle collaterali di Schaffer, in CA1.

Per tale motivo è possibile ipotizzare come tali cellule siano implicate in a meccanismi regolatori di tipo sia feedforward che feedback (Sik et al., 1995).

Per quanto riguarda le cellule trilaminari orizzontali, esse presentano dendriti confinati allo strato oriens, suggerendo così che la fonte di input eccitatori a tali interneuroni possa essere costituita dalle collaterali ricorrenti delle cellule piramidali in CA1, analogamente alle cellule O-LM (Figura 10) (Blasco-Ibanez e Freund, 1995).

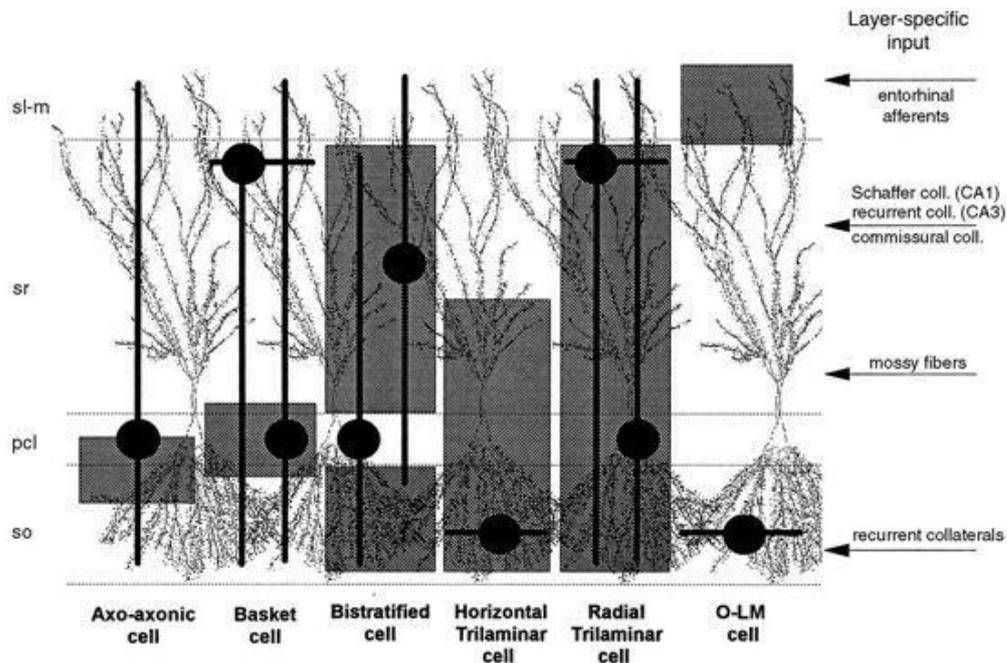


Figura 10. Classificazione morfologica degli interneuroni dell'ippocampo propriamente detto. I cerchi neri indicano i corpi cellulari; le linee spesse rappresentano l'orientamento principale e la distribuzione laminare dei dendriti. I neuroni piramidali sono illustrati in secondo piano. E' indicata anche la distribuzione laminare dei diversi input (Modificato da Freund e Buzsaki, 1996).

Nello strato radiato, oltre alle cellule bistratificate, sono presenti altri interneuroni i cui alberi dendritici restano confinati a tale strato. I loro assoni tendono a ramificarsi a livello locale e a contrarre sinapsi principalmente con i dendriti delle cellule piramidali (Freund e Buzsaki, 1996).

### 3.1.4.3. Neuroni LM

I neuroni LM (neuroni dello strato lacunoso-molecolare) hanno il soma o nello strato lacunoso-molecolare o al confine tra questo e lo strato radiato.

I loro dendriti sono orientati orizzontalmente e solo occasionalmente inviano branche che si portano fino allo strato piramidale.

Anche gli assoni di questi interneuroni si estendono per lo più in orizzontale, ramificandosi nello strato lacunoso-molecolare e nella parte

più superficiale dello strato radiato, dove contraggono sinapsi simmetriche con i dendriti distali dei neuroni piramidali (Kunkel et al., 1988; Lacaille e Schwartzkroin, 1988a,b; Williams et al., 1994; Freund e Buzsaki, 1996).

#### 3.1.4.4. Cellule IS

Le cellule IS (*interneuron-selective*) si possono suddividere in tre tipologie (IS-1, IS-2, IS-3) in base alle loro caratteristiche neurochimiche e alla loro connettività.

Il corpo cellulare delle cellule IS-1 si trova sia nel giro dentato (principalmente nello strato dei granuli e nel polimorfo) sia in tutti gli strati dell'ippocampo propriamente detto, soprattutto nel campo CA1.

Tali neuroni possono essere identificati utilizzando l'anticorpo per la proteina legante il calcio calretinina.

L'input eccitatorio principale a tali interneuroni sembra provenire principalmente dalle fibre commissurali/associative o dalle collaterali di Schaffer.

La caratteristica peculiare di tali neuroni, così come delle cellule IS-2 e IS-3; è che essi contraggono sinapsi unicamente con altri interneuroni; in particolare le IS-1 con neuroni calbindina-immunoreattivi (Acsàdy et al., 1996b; Freund e Buzsaki, 1996; Gulyàs et al., 1996).

Le cellule IS-2 si trovano solo nell'ippocampo propriamente detto, a livello di strato radiato, e mostrano immunoreattività per il VIP.

Il target di questi interneuroni è rappresentato da altri interneuroni calbindina-immunopositivi.

Gli input alle cellule IS-2 sembrano provenire dalla corteccia entorinale. (Acsàdy et al., 1996a,b).

Gli interneuroni che terminano direttamente sulle cellule piramidali sono perciò soggette a un doppio controllo inibitorio interneuronale da

parte delle cellule IS-1 e IS-2, guidato rispettivamente dalle fibre commissurali/associative (o dalle collaterali di Schaffer) e dalla corteccia entorinale (Acsàdy et al., 1996a,b; Gulyàs et al., 1996).

Le cellule IS-3 sono presenti a livello di giro dentato (strato molecolare e strato dei granuli) e di ippocampo propriamente detto. In quest'ultimo, i corpi cellulari si trovano nello strato radiato o piramidale.

Ogni cellula IS-3 possiede un dendrite apicale che si porta allo strato lacunoso-molecolare e un processo assonico che va allo strato oriens.

Le afferenze sembrano essere di provenienza corticale (corteccia entorinale), mentre i loro target sono costituiti da interneuroni al confine tra strato oriens ed alveo, responsabili a loro volta di un controllo inibitorio sui dendriti delle cellule principali dell'ippocampo propriamente detto (Acsàdy et al., 1996a,b; Hájos et al., 1996).

## **3.2. CONNESSIONI INTRINSECHE**

### **3.2.1. Connessioni del campo CA3**

#### **3.2.1.1. Collaterali di Schaffer**

Le collaterali di Schaffer sono costituite dalle proiezioni dei neuroni piramidali del campo CA3 e rappresentano l'input principale ai neuroni piramidali di CA1 (Figura 11).

Le collaterali di Schaffer si estendono nello strato radiato in CA3 e negli strati radiato e oriens in CA1. Per tale motivo gli assoni che costituiscono tale proiezione terminano a livello di dendriti basali nello strato oriens e a livello di dendriti apicali nello strato radiato.

Ogni singola cellula nel campo CA3 origina un assone che può innervare fino a due-terzi dell'intera estensione setto-temporale dell'ippocampo propriamente detto.

Tutte le porzioni dei campi CA3 proiettano al campo CA1; tali proiezioni non sono caotiche e casuali, ma seguono una ben precisa organizzazione topografica. Infatti la distribuzione delle terminazioni in CA1 dipende dalla localizzazione trasversale delle cellule di origine in CA3 e CA2.

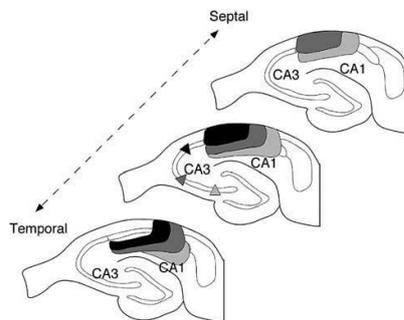


Figura 11. Organizzazione delle proiezioni dal campo CA3 al campo CA1. Le cellule di origine sono indicate come triangoli nella sezione centrale. I terminali assonici di tali neuroni sono indicati da aree di colore corrispondenti all'area di origine (Amaral et al., 2014: The Hippocampus Book).

I neuroni del campo CA3 nelle vicinanze del giro dentato (area prossimale del campo CA3), oltre a proiettare in direzione sia settale che temporale per lunghe distanze, tendono ad inviare input a livelli del campo CA1 più settali rispetto alla loro posizione. Le cellule del campo CA3 vicine a CA1, al contrario, proiettano in maggior misura a livelli temporali del campo CA1.

All'interno, o vicino, al livello setto-temporale delle cellule di origine, queste cellule situate prossimalmente nel campo CA3 danno origine a collaterali che tendono a terminare superficialmente nello strato radiato. Al contrario, cellule d'origine situate più distalmente nel campo CA3 danno origine a proiezioni che terminano più profondamente nello strato radiato e nello strato oriens.

A prescindere dall'origine setto-temporale o trasversale di una proiezione, la più alta densità di fibre e terminazione presenti nel campo CA1 proviene dalle parti più profonde dello strato radiato e dello strato oriens e si dirige fuori dallo strato oriens verso parti superficiali dello strato radiato a livelli più temporali rispetto all'origine. Inoltre, la più alta densità di fibre e terminazioni nel campo CA1 si sposta prossimalmente (verso il campo CA3) a livelli più settali rispetto all'origine e distalmente (verso il subicolo) a livelli più temporali rispetto all'origine.

Ogni singolo neurone del campo CA3 dà origine ad un complesso e multiramificato plesso assonico che termina in un'ampia area del campo CA1, sia ipsilaterale che controlaterale (Li et al., 1994). Collaterali di singoli assoni presenti nel campo CA3 percorrono direzioni sia lineari che oblique attraverso il campo CA1 e lo stesso assoni proveniente dal campo CA3 può terminare sul dendrite apicale di un neurone e sul dendrite basale di un altro. 3.2.1.2. Proiezioni commessurali/d'associazione

Le cellule piramidali del campo CA3 danno origine ad assoni che staccano numerose collaterali che si distribuiscono all'interno dell'ippocampo propriamente detto ipsilaterale (proiezioni associative) e alle aree corrispondenti dell'ippocampo propriamente detto controlaterale (proiezioni commessurali) (Blackstad, 1956; Swanson e Cowan, 1977; Swanson *et al.*, 1978; Swanson *et al.*, 1980).

Nel ratto (Blackstad, 1956), ma non nella scimmia (Amaral et al., 1984; Demeter et al., 1985), le cellule piramidali del campo CA3 danno origine a proiezioni commessurali che raggiungono le aree CA1, CA2 e CA3 dell'ippocampo propriamente detto controlaterale (Swanson et al., 1978).

Una caratteristica importante delle proiezioni d'associazione CA3-CA3 e delle collaterali di Schaffer dal campo CA3 a quello CA1 è che

entrambe sono distribuite in maniera divergente lungo l'asse setto-temporale. In una serie di studi, Tamamaki et al. (1984, 1988) hanno dimostrato che una singola cellula piramidale dei campi CA3 o CA2 dà origine a plessi assonici altamente ramificati che si distribuiscono, sia ipsilateralmente che controlateralmente, al 75% dell'estensione setto-temporale del campo CA1.

Questi dati depongono fortemente a sfavore del concetto che l'elaborazione delle informazione all'interno della formazione ippocampale si sviluppi in modo esclusivamente lamellare. Piuttosto la distribuzione del flusso d'informazione sembra essere tanto ampia nell'asse setto-temporale, quanto in quello trasversale

Le proiezioni d'associazione dal campo CA3 a quello CA3 sono organizzate in una maniera altamente sistematica. Un'aspetto particolare di questa proiezione è che cellule situate prossimalmente nel campo CA3 comunicano, agli stessi livelli adiacenti setto-temporali, solamente con le cellule situate nella porzione prossimale dell'area CA3. Proiezioni di associazione derivanti da porzioni centrali e distali del campo CA3, comunque, proiettano al campo CA3 sia nel suo spessore trasversale che nella sua estensione setto-temporale (Ishizuka et al., 1990).

La densità delle proiezioni di associazione dal campo CA3 varia lungo l'asse setto-temporale. Il gradiente radiale di terminazione (da superficiale a profondo degli strati radiato ed oriens) è simile a quello descritto per la proiezione dal campo CA3 al campo CA1. Il gradiente trasversale è, tuttavia, il contrario. Proiezioni dall'area CA3 all'area CA3 si dirigono prossimalmente se le cellule d'origine sono localizzate a livello temporale, mentre si portano distalmente se queste sono localizzate più a livello settale.

Come con le proiezioni commessurali dal giro dentato, le fibre provenienti dal campo CA3 che giungono all'ippocampo propriamente

detto controlaterale, formano sinapsi asimmetriche sulle spine delle cellule piramidali dei campi CA3 e CA1 (Gottlieb e Cowan, 1973), ma terminano anche sui dendriti degli interneuroni (Frotscher et al., 1984).

### 3.2.2. Conessioni del campo CA2

Le connessioni intra-ippocampali del campo CA2 ricordano, in parte, quelle della porzione distale del campo CA3, ma presentano anche caratteristiche distintive. Come nel campo CA3, i corpi cellulari in CA2 danno origine a proiezioni dirette al campo CA1. Tali proiezioni sono, comunque, piuttosto sparse e diffuse e non seguono linearmente le regole di gradiente descritte per le proiezioni da CA3 a CA1 (Ishizuka *et al.*, 1990).

È interessante notare come vi siano molte più collaterali che partono dal campo CA2 e si distribuiscono allo strato polimorfo del giro dentato, rispetto a quelle che originano dal campo CA3.

### 3.2.3. Conessioni del campo CA1 e proiezioni subicolari

A differenza del campo CA3, le cellule piramidali in CA1 non sembrano dare origine a molte collaterali distribuite all'interno dello stesso campo (Amaral *et al.*, 1991; Tamamaki *et al.*, 1987).

Durante il percorso degli assoni all'interno dell'alveo o nello strato oriens verso il subicolo, collaterali occasionali si staccano e sembrano penetrare all'interno dello strato oriens e nello strato delle cellule piramidali.

Tuttavia è evidente che la vasta rete di associazione, tanto evidente nel campo CA3, non è altrettanto rilevante in CA1.

Anche le connessioni commissurali del campo CA1 sono scarse, poiché solamente un piccolo numero di neuroni proietta alla medesima area controlaterale (Van Groen e Wyss, 1990).

Il campo CA1 è il punto da cui originano due importanti proiezioni del circuito ippocampale: la prima è organizzata topograficamente e diretta all'adiacente subicolo; la seconda innerva gli strati profondi della corteccia entorinale.

Gli assoni delle cellule piramidali dell'area CA1, facenti parte della prima delle due suddette proiezioni, si portano dapprima nello strato oriens o nell'alveo per poi piegare ad angolo acuto verso il subicolo (Finch e Babb, 1981; Finch et al., 1983; Tamamaki et al., 1988; Amaral et al., 1991). Le fibre, quindi, rientrano nello strato delle cellule piramidali del subicolo e si ramificano profusamente nello strato delle cellule piramidali e nella porzione profonda dello strato molecolare.

Diversamente dalla proiezione dal campo CA3 a quello CA1, la proiezione dal campo CA1 termina nel subicolo in colonne topograficamente molto ben organizzate. Le cellule dell'area CA1 situate prossimalmente proiettando al terzo distale del subicolo, mentre cellule del campo CA1 più distali inviano assoni solo nella porzione prossimale del subicolo; la proiezione mediana dell'area CA1 proietta, invece, alla porzione mediana del subicolo (Amaral et al., 1991).

Tamamaki et al. (1988) hanno iniettato *horseradish peroxidase* in singole cellule piramidali del campo CA1, dimostrando che ogni singolo neurone in CA1 si porta a circa un terzo dell'estensione trasversale e setto-temporale dello strato delle cellule piramidali subicolari. Sembra, perciò, che la proiezione dal campo CA1 al subicolo suddivida questa struttura in circa in tre parti.

Pertanto la proiezione dal campo CA1 al subicolo, proprio come quella dal campo CA3 a quello CA1, sembra essere organizzata in un modo

divergente, poiché una piccola porzione del campo CA1 proietta all'incirca a un terzo dell'estensione setto-temporale del subicolo (Figura 12).

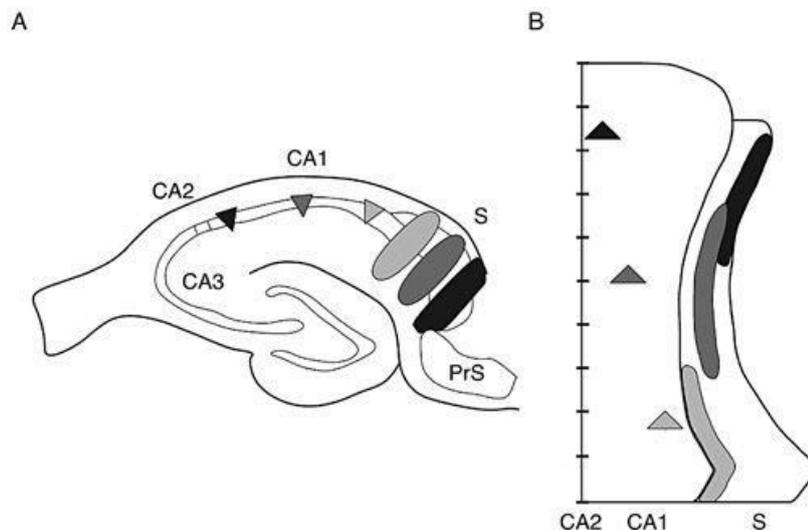


Figura 12. Organizzazione delle proiezioni dal campo CA1 al subicolo. La sezione coronale mostra le cellule di origine (triangoli) ed i terminali assonici di tali neuroni (aree di colore corrispondenti) (Amaral et al., 2014: The Hippocampus Book).

### 3.3. CONNESSIONI ESTRINSECHE

#### 3.3.1. Proiezioni dalla corteccia entorinale

I terminali assonici provenienti dai neuroni della corteccia entorinale si distribuiscono per tutta l'estensione dello strato lacunoso molecolare dell'ippocampo propriamente detto.

I neuroni che proiettano al campo CA3 si trovano nello strato II della corteccia entorinale. Le loro terminazioni assoniche hanno un'organizzazione laminare: le proiezioni della corteccia entorinale laterale terminano superficialmente nello strato-molecolare; quelle provenienti dalla corteccia entorinale mediale, terminano invece più in profondità (Witter, 1993).

Il soma dei neuroni che proiettano al campo CA1 si trova nello strato III della corteccia entorinale. Le terminazioni assoniche sono distribuite

topograficamente: le proiezioni della corteccia entorinale laterale terminano nella parte distale di CA1 (vicino al subicolo); quelle provenienti dalla corteccia entorinale mediale si portano alla parte prossimale (vicino al campo CA2).

L'uniche cellule dell'ippocampo che inviano input alla corteccia entorinale sono i neuroni piramidali del campo CA1 (Naber et al., 2001).

### 3.3.2. Proiezioni neocorticali e amigdaloidee

Le connessioni tra ippocampo e neocorteccia sono presenti unicamente a livello di campo CA1, mentre sono assenti nei campi CA2 e CA3.

Le proiezioni principali derivano dalla corteccia peririnale e postrinale; i terminali assonici si portano allo strato lacunosomolecolare del campo CA1. I neuroni piramidali di CA1 a loro volta riproiettano alle medesime aree.

I neuroni del campo CA1 inviano input anche alla corteccia retrospleniale e alla corteccia mediale frontale (Jay et al., 1989; Van Groen e Wyss, 1990).

Inoltre la parte distale del campo CA1 è reciprocamente connessa con il complesso amigdaloideo. Proiezioni dal nucleo basale dell'amigdala terminano a livello di strato oriens e strato radiatum, al confine tra campo CA1 e subiculum (Van Groen e Wyss, 1990).

### 3.3.3. Proiezioni settali

Il nucleo settale è la fonte principale di input sottocorticali al campo CA3. Come avviene nel giro dentato, la proiezione settale origina

principalmente nel nucleo mediale settale e nel nucleo della bendelletta diagonale del Broca.

Questa proiezione sembra terminare principalmente nello strato oriens e meno diffusamente nello strato radiato (Nyakas et al., 1987; Gaykema et al., 1990;).

Il campo CA1 sembra ricevere meno proiezioni settali, comunque distribuite soprattutto allo strato oriens (Nyakas et al., 1987).

Come nel giro dentato, la componente GABAergica della proiezione settale al campo CA3 termina sugli interneuroni GABAergici (Freund e Antal, 1988; Gulyás et al., 1990).

L'unica proiezione sottocorticale considerevole proveniente dal campo CA3 è quella diretta al nucleo settale laterale (Swanson e Cowan, 1977). La proiezione dal campo CA3 al complesso settale è distinta dalle altre proiezioni ippocampali per il fatto che è bilaterale: alcune fibre provenienti dall'area CA3 innervano il settale laterale controlaterale.

Questa via è topograficamente organizzata. Porzioni settali del campo CA3 proiettano dorsalmente nel nucleo settale laterale; parti progressivamente più temporali dell'area CA3 proiettano più ventralmente. Cellule del campo CA3 poste in posizione prossimale tendono a inviare fibre medialmente nel nucleo settale laterale, mentre cellule situate distalmente nel campo CA3 hanno assoni che terminano più lateralmente (Siegel et al., 1974, 1975; Swanson e Cowan, 1977; Gaykema et al., 1991).

Anche i neuroni piramidali di CA1 proiettano al nucleo settale laterale, ma le loro proiezioni sono unicamente ipsilaterali.

#### 3.3.4. Proiezioni ipotalamiche

Solo il campo CA2 sembra ricevere un'innervazione particolarmente cospicua dall'ipotalamo posteriore, in particolare dall'area

sopramammillare (Haglund et al., 1984) e dal nucleo tubero-mammillare (Köhler et al., 1985). Queste proiezioni terminano principalmente sui neuroni piramidali (Magloczky et al., 1994).

In letteratura i dati riguardanti l'innervazione estrinseca del campo CA2 sono scarsi, ma in generale quest'area sembra mostrare le medesime connessioni del campo CA3.

### 3.3.5. Proiezioni talamiche

Gli input talamici alla formazione ippocampale hanno ricevuto relativamente poca attenzione. Herkenham (1978), tuttavia, ha dimostrato che alcune aree della formazione ippocampale ricevono fibre provenienti dalle regioni della linea mediana del talamo (“non specifiche”).

In particolare, il nucleo *reuniens* dà origine ad un'abbondante proiezione allo strato lacunoso-molecolare del campo CA1 che innerva tutti i livelli setto-temporali, con una preferenza per quelli intermedi.

Tale proiezione è topograficamente organizzata: la porzione dorsale del nucleo *reuniens*, infatti, tende a proiettare alle porzioni più settali del campo CA1, mentre la porzione ventrale proietta soprattutto nelle porzioni poste più temporalmente nel campo CA1.

Le fibre nervose provenienti dal nucleo *reuniens* formano sinapsi asimmetriche a livello di dendriti di neuroni piramidali e di interneuroni GABAergici (Wouterlood et al., 1990; Dolleman-Van der Weel e Witter, 2000).

### 3.3.6. Proiezioni monoaminergiche del tronco encefalico

L'ippocampo propriamente detto riceve, analogamente al giro dentato, input noradrenergici e serotoninergici dai nuclei del tronco

encefalico. In generale CA1 riceve un'innervazione monoaminergica inferiore rispetto a CA3.

Le fibre noradrenergiche originano dal *locus coeruleus* e si distribuiscono principalmente nello strato lucido e nella porzione più superficiale dello strato lacunoso-molecolare.

Le poche fibre serotoninergiche che proiettano all'ippocampo propriamente detto sono distribuite in maniera più diffusa rispetto al contingente noradrenergico; esse terminano sugli interneuroni ippocampali, potenziandone l'attività inibitoria (Freund et al., 1990).

L'innervazione dopaminergica è pressoché assente (Swanson et al., 1987).

## **4. SUBICOLO**

### **4.1. ORGANIZZAZIONE CITOARCHITETTONICA**

Le caratteristiche citoarchitettoniche del subicolo di ratto non sono state studiate, a tutt'oggi, nei loro minimi dettagli. Molti dei dati odierni derivano da ricerche condotte nel topo da Ramón y Cajal e Lorente de Nó.

Il confine tra il campo CA1 ed il subicolo è evidenziato principalmente da un improvviso ampliamento dello strato delle cellule piramidali (strato II).

Lo strato radiato del campo CA1 è sostituito dallo strato molecolare del subicolo (strato I), il quale è piuttosto spesso e può essere suddiviso in una porzione più profonda, in continuazione con lo strato radiato del campo CA1, ed in una porzione più superficiale, in continuità con lo strato molecolare del presubicolo e del campo CA1.

Lo strato oriens non è presente nel subicolo, dove, comunque, è possibile apprezzare uno strato III non sempre bene definito (Blackstad, 1956; Haug, 1976; Swanson et al., 1987).

#### **4.1.1. Tipi cellulari**

Lo strato II è composto da neuroni piramidali di grandi dimensioni i cui dendriti apicali si estendono nello strato molecolare, mentre quelli basali si portano alle porzioni più profonde dello strato delle cellule piramidali.

I neuroni piramidali del subicolo, in base alle loro caratteristiche elettrofisiologiche, possono essere distinti in due gruppi principali:

*intrinsically bursting cells (busters; IBC)* e *regular spiking cells (nonbusters; RSC)* (O'Mara et al., 2001).

Le IBC esprimono somatostatina e sono presenti soprattutto nella parte profonda dello strato delle cellule piramidali. Le RSC sono, al contrario, più numerose nella parte superficiale dello strato II e sono NADPH-diaphorase- e ossido nitrico sintetasi neuronale-positive (Valtschanoff et al., 1993; Greene e Mason, 1996; Greene e Totterdell, 1997; Greene et al., 1997; Lin e Totterdel, 1998).

I due tipi di neuroni piramidali sopradescritti sembrano differire anche per le connessioni che stabiliscono. Sembra, infatti, che solo le IBC proiettino alla corteccia entorinale (Gigg et al., 2000).

Tra questa popolazione cellulare morfologicamente omogenea sono presenti cellule di dimensioni minori che presumibilmente sono interneuroni (Swanson et al., 1987). Nell'ambito della popolazione interneuronale GABAergica del subicolo sono stati evidenziati anche neuroni contenenti parvalbumina.

## **4.2. CONNESSIONI INTRINSECHE**

Il subicolo dà origine ad una proiezione longitudinale d'associazione che si estende dal livello delle cellule d'origine fino a gran parte del subicolo. Le fibre d'associazione terminano diffusamente in tutti gli strati subicolari (Köhler, 1985).

Il subicolo di ratto non presenta a considerare connessioni commessurali (Swanson e Cowan, 1977; Köhler, 1985).

I neuroni piramidali subicolari forniscono un importante input locale allo strato II. È interessante notare come la densità delle connessioni intrinseche sia molto maggiore rispetto al campo CA1.

I due tipi di neuroni piramidali subicolari differiscono per il tipo di connettività intrinseca: i terminali assonici delle IBC restano confinati alla regione circoscritta dai loro dendriti apicali (organizzazione colonnare); le RSC, invece, originano singoli assoni che si estendono lungo l'asse trasverso del subicolo (Figura 13). Riguardo l'estensione assonica lungo l'asse setto-temporale, non è ancora noto se esistono differenze tra IBC e RSC.

Nonostante le connessioni subicolari vadano studiate più approfonditamente, i dati disponibili indicano che la connettività intrinseca è differente rispetto ai campi ippocampali CA1 e CA3. Infatti a livello subicolare è presente un'organizzazione sia colonnare che laminare: le RSC integrano l'attività colonnare delle IBC lungo l'asse trasverso (Figura 13) (Köhler, 1985; Harris et al., 2001).

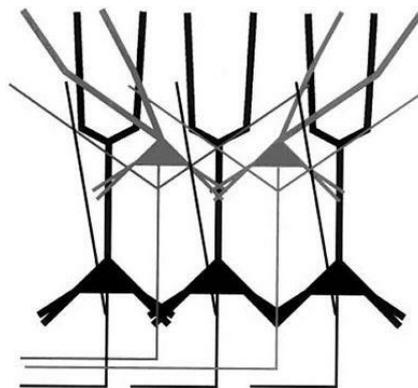


Figura 13. Modello di organizzazione intrinseca subicolare. Le cellule situate più in profondità (IBC) hanno collaterali assoniche che si portano in prossimità dei dendriti prossimali (organizzazione colonnare). I neuroni superficiali (RSC) possiedono collaterali assoniche che si distribuiscono secondo l'asse trasversale (organizzazione laminare) (Modificato da Harris et al., 2001).

## 4.3. CONNESSIONI ESTRINSECHE

### 4.3.1. Proiezioni subicolari a presubicolo e parasubicolo

Il subicolo genera una proiezione diretta al presubicolo, dove le fibre terminano quasi esclusivamente nello strato I. La proiezione alla parte

dorsale del presubicolo termina in modo leggermente diverso a causa della sua più cospicua distribuzione nello strato V e, in misura minore, negli strati I e II.

Le proiezioni che dal subicolo si portano al parasubicolo terminano specialmente nello strato I e nella porzione superficiale dello strato II (Swanson et al., 1978; Köhler, 1985; Van Groen e Wyss, 1990a,b).

Queste proiezioni sono topograficamente organizzate, così che le parti settali o dorsali del subicolo proiettano a parti dorsali e caudali sia del presubicolo che del parasubicolo; le parti temporali o ventrali del subicolo proiettano, invece, a porzioni ventrali e rostrali dei due campi suddetti (Swanson e Cowan, 1977; Van Groen e Wyss, 1990a,b).

#### 4.3.2. Connessioni tra subicolo e corteccia entorinale

Nonostante le proiezioni provenienti dalla corteccia entorinale siano state per lungo tempo oggetto di controversia, Witter et al. (1992) hanno osservato che il subicolo riceve una forte proiezione dalla corteccia entorinale. A seconda dell'allocazione delle cellule d'origine nella corteccia entorinale, le fibre sono dirette verso ristrette porzioni trasversali del subicolo e terminano nei due terzi esterni dello strato molecolare.

La componente laterale della via perforante proietta soprattutto alla parte del subicolo adiacente all'area CA1 (cioè la porzione subicolare prossimale) mentre la componente mediale si distribuisce a porzioni subicolari più distali (vicino al presubicolo) (Witter, 1993). Tali proiezioni nascono principalmente dallo strato III, sebbene siano presenti anche alcuni assoni provenienti da cellule dello strato II (Lingenhöhl e Finch, 1991; Tamamaki e Nojyo, 1993).

Il subicolo proietta a sua volta alla corteccia entorinale: la proiezione subicolo-entorinale termina principalmente nell'area entorinale mediale.

La maggior parte delle fibre della proiezione subicolare termina nello strato dei neuroni piramidali di grandi dimensioni posti appena al di sotto della stessa lamina dissecans (Swanson e Cowan, 1977; Beckstead, 1978; Finch et al., 1983, 1986; Köhler, 1985; Bartesaghi et al., 1989; Witter et al., 1989a). Una componente minore della proiezione subicolare si estende anche superficialmente alla lamina dissecans, soprattutto nello strato III.

Le fibre subicolari formano generalmente sinapsi asimmetriche con spine e con dendriti degli strati profondi della corteccia entorinale (Jones, 1993).

Nel ratto le proiezioni dal subicolo alla corteccia entorinale sono strettamente ipsilaterali (Swanson et al., 1978; Köhler, 1985); nel gatto e nella scimmia, invece, sono state descritte anche proiezioni controlaterali (Van Groen e Wyss, 1988).

#### 4.3.3. Proiezioni subicolari corticali e subcorticali

Dal subicolo originano la maggior parte delle efferenze provenienti dalla formazione ippocampale. Il subicolo è infatti la fonte principale di proiezioni subcorticali al diencefalo e al tronco encefalico (attraverso il fornice post-commesurale) (Swanson e Cowan, 1975; Swanson et al., 1981; Donovan e Wyss, 1983; Groenewegen et al., 1987; Witter e Groenewegen, 1990; Witter et al., 1990; Canteras e Swanson, 1992; Naber e Witter, 1998; Ishizuka, 2001; Kloosterman et al., 2003).

Tra le proiezioni principali a cui dà origine vi sono quelle dirette alla corteccia prefrontale mediale (particolarmente alle cortecce orbito-frontali mediale e ventrale) e alle cortecce prelimbica ed infralimbica. Nelle cortecce orbito-frontale e pre-limbica le fibre subicolari innervano soprattutto gli strati profondi, mentre nella corteccia infra-limbica anche gli strati più superficiali ricevono una proiezione. Alcune fibre subicolari che

raggiungono la corteccia infra- limbica prendono contatto con cellule che proiettano al nucleo del tratto solitario (Ruit e Neafsey, 1990).

Alcune proiezioni subicolari raggiungono anche porzioni mediali del nucleo olfattivo anteriore e la corteccia del cingolo anteriore (area 24) (Jay et al., 1989; Witter et al., 1989b, 1990; Ruit e Neafsey, 1990; White et al., 1990; Jay e Witter, 1991).

Dai due terzi più dorsali del subicolo origina la proiezione subicolo-retrospleniale che termina principalmente negli strati II e III, con una modesta innervazione dello strato IV (Witter et al., 1989b, 1990; Wyss e Van Groen, 1992).

Anche la corteccia peririnale riceve un forte input dal subicolo, le cui fibre terminano in strati sia superficiali che profondi (Swanson e Cowan, 1977; Swanson et al., 1978; Deacon et al., 1983; Witter et al., 1989b).

Le proiezioni subcorticali più rilevanti sono quelle dirette al complesso settale ed ai nuclei mammillari. La proiezione all'area settale è principalmente ipsilaterale e termina in tutte le suddivisioni dei nuclei settali laterali, sebbene alcune fibre terminino anche nel nucleo mediale settale (Gaykema et al., 1991).

Strettamente associata alla proiezione settale è anche la proiezione al nucleo *accumbens* ed alle parti adiacenti del tubercolo olfattivo. Fibre subicolari si distribuiscono a tutto il nucleo *accumbens*, ma con una maggior densità nella sua porzione caudo-mediale (Kelley e Domesick, 1982; Groenewegen et al., 1987; Witter et al., 1990).

Le proiezioni subicolari ai nuclei mammillari originano principalmente dai due terzi dorsali del subicolo e sono distribuite bilateralmente (Swanson e Cowan, 1977; Donovan e Wyss, 1983; Witter et al., 1989b, 1990; Witter e Groenewegen, 1990; Canteras e Swanson, 1992). Esse sono distribuite in tutti i nuclei mediali mentre il nucleo mammillare laterale mostra una scarsa innervazione. Fibre subicolari sono distribuite

anche alla regione ipotalamica laterale dove possono interagire con le cellule istaminergiche che proiettano alla formazione ippocampale (Wouterlood e Tuinhof, 1992).

Anche il talamo riceve un input subicolare (Meibach e Siegel, 1977; Witter et al., 1990; Canteras e Swanson, 1992). Fibre subicolari terminano bilateralmente nel nucleo *reuniens*, nel nucleo interanteromediale, nel nucleo paraventricolare e nel nucleo gelatinoso. Sebbene siano state descritte proiezioni subicolari a porzioni del gruppo nucleare anteriore del talamo (Swanson e Cowan, 1977), studi con traccianti anterogradi hanno mostrato che queste derivano soprattutto dal presubicolo (Van Groen e Wyss, 1990a,b; Witter e Groenewegen, 1990; Witter et al. 1990).

Infine, il terzo ventrale del subicolo invia proiezioni al complesso amigdaloideo, soprattutto al nucleo amigdaloideo basale accessorio.

Il subicolo invia abbondanti proiezioni al nucleo interstiziale della stria terminale, mentre poche fibre subicolari si portano alla porzione ventrale del *claustrum* (nucleo endopiriforme) (Witter et al., 1990; Canteras e Swanson, 1992).

#### 4.3.4. Proiezioni corticali e subcorticali al subicolo

Nel ratto c'è scarsa di dettagliate informazioni a riguardo degli input corticali che direttamente si portano al subicolo. Molte delle regioni corticali che proiettano fibre alla corteccia entorinale sembrano non inviare proiezioni al subicolo.

Nessun input, ad esempio, è stato visto collegare le cortecce prelimbica ed infralimbica con il subicolo (Sesack et al., 1989). In modo analogo, nessuna porzione della corteccia retrospleniale proietta al subicolo (Wyss e Van Groen, 1992).

Riguardo alla corteccia del cingolo ci sono state pubblicazioni piuttosto contraddittorie sulla presenza o meno di proiezioni subicolari. Uno studio combinato di elettrofisiologia e neuroanatomia ha riportato una proiezione dalla corteccia del cingolo (area 24) al subicolo (White et al., 1990); tuttavia in altri studi non ci sono state ulteriori evidenze di proiezioni di questo tipo (Vogt e Miller, 1983; Sesack et al., 1989).

La corteccia peririnale (area 35) dà luogo ad una proiezione subicolare, ma questa termina solo nel terzo prossimale del campo, più precisamente al confine con l'area CA1 (Kosel et al., 1983).

Contrariamente al ridotto numero di input corticali diretti al subicolo, quelli che originano da regioni sottocorticali sono più numerosi. Dal momento che le proiezioni sottocorticali al subicolo originano dalle stesse fonti che innervano gli altri campi ippocampali, ci limiteremo ad una breve descrizione di questi input.

Dal telencefalo basale, in particolare dal nucleo mediale settale e dal nucleo della bendelletta diagonale del Broca, originano fibre che terminano negli strati piramidale e molecolare (Swanson e Cowan, 1977; Chandler e Crutcher, 1983; Nyakas et al., 1987; Swanson et al., 1987; Lopes da Silva et al., 1990).

La porzione prossimale del subicolo riceve anche input dalla porzione parvicellulare del nucleo basale (Krettek e Price, 1977), dal nucleo corticale posteriore e dall'adiacente area amigdalolo-ippocampale del complesso amigdaloidale (Canteras et al., 1992a). Questi input amigdaloidali terminano principalmente nella regione di confine tra il campo CA1 ed il subicolo, dove innervano preferenzialmente lo strato molecolare del subicolo e dello strato lacunoso-molecolare dell'area CA1.

Gli input talamici al subicolo sono simili anch'essi a quelli diretti al campo CA1; essi originano principalmente dai nuclei *reuniens*, nucleo paraventricolare e parateniale. Le estremità dorsale e ventrale del subicolo

sembrano esser prive di un input provenienti dal nucleo *reuniens*. Le proiezioni dal talamo mediale terminano principalmente nello strato molecolare del subicolo (Herkenham, 1978; Wouterlood et al., 1990), dove corrono parallele a quelle provenienti dalla corteccia entorinale. E' interessante notare che le proiezioni al subicolo ed all'area CA1 originano da popolazioni differenti, ma frammisti tra loro, di neuroni nel nucleo *reuniens* (Dolleman-Van der Weel e Witter, 2000;).

Vie ascendenti monoaminergiche dal *locus coeruleus* (noradrenergico), dall'area tegmentale ventrale (dopaminergica) e dai nuclei mediano e dorsale del rafe (serotoninergici), raggiungono il subicolo, ma non possiedono un'innervazione esclusivamente preferenziale a questa regione.

La proiezione dalla regione sopramammillare (Haglund et al., 1984), diversamente, proietta in modo evidente al subicolo, in particolare al subicolo ventrale; questa porzione del subicolo, inoltre, riceve fibre istaminergiche anche dal nucleo premammillare (Canteras et al., 1992b).

#### 4.3.5. Topografia delle proiezioni subicolari

Analogamente alle proiezioni dal campo CA3 al campo CA1 e dal CA1 al subicolo, anche le proiezioni efferenti subicolari sono organizzate in modo topografico. Esse rispettano in gran parte la topografia trasversale stabilita dalla proiezione CA1-subicolo, differendo solo per talune proiezioni derivanti dai terzi prossimali, mediali e distali del subicolo.

Questo aspetto dimostra una marcata topografia setto-temporale, così che proiezioni provenienti dalle regioni settali o dorsali del subicolo sono differenti rispetto a quelle originantesi da porzioni temporali o ventrali (Witter e Amaral, 2004).

In riferimento alla topografia setto-temporale, sembra che le proiezioni alla corteccia entorinale, al complesso settale laterale, al nucleo *accumbens* ed al nucleo mammillare mediale originino dall'intera estensione setto-temporale del subicolo (Witter e Groenewegen, 1990; Ishizuka, 2001).

I diversi livelli setto-temporali, comunque, proiettano a porzioni differenti di queste strutture. L'origine dorsale o ventrale delle proiezioni subicolari dirette alla corteccia entorinale sono in relazione alla corrispondente sede di terminazione latero-mediale nella corteccia entorinale stessa. I livelli dorsali del subicolo, infatti, proiettano soprattutto a porzioni laterali e caudali della corteccia entorinale (ad esempio le parti che si trovano nelle vicinanze del solco rinale); livelli progressivamente più ventrali del subicolo proiettano, invece, a porzioni della corteccia entorinale situate più medialmente.

Nel nucleo *accumbens*, la porzione dorsale del subicolo proietta soprattutto caudo-medialmente, mentre quella ventrale invia fibre soprattutto rostro-lateralmente (Groenewegen et al., 1987).

Le porzioni dorso-mediali del complesso settale laterale ricevono input originatisi dai livelli settali del subicolo, mentre le porzioni ventrali sono innervate da fibre che prendono origine in parti del subicolo più localizzate in direzione temporale (Swanson e Cowan, 1977).

Una topografia setto-temporale simile è stata descritta anche per le proiezioni subicolari dirette al presubicolo ed ai nuclei mammillari mediali ipotalamici (Swanson e Cowan, 1977; Witter et al., 1990). Quest'ultima proiezione nasce principalmente dai due terzi dorsali del subicolo, mentre il terzo ventrale dà origine a proiezioni che si portano ad altre regioni ipotalamiche, in particolare al nucleo ventro-mediale e regioni ad esso adiacenti (Witter e Groenewegen, 1990).

Questa dicotomia tra i due terzi dorsali ed il terzo ventrale del subicolo si riflette nell'organizzazione di altre proiezioni, come, ad esempio, quelle dirette all'amigdala ed al nucleo interstiziale della stria terminale (queste infatti originano esclusivamente dal terzo ventrale del subicolo) e a quelle dirette corteccie retrospleniale e peririnale (che nascono dai due terzi dorsali del subicolo).

Le proiezioni subicolari al talamo mediale dimostrano una topografia setto-temporale frazionata. La parte subicolare più dorsale proietta preferenzialmente al nucleo inter-antero-mediale, mentre i livelli medio-setto-temporali del subicolo proiettano al nucleo *reuniens*; infine, il terzo ventrale del subicolo invia numerose proiezioni al nucleo paraventricolare (Witter e Groenewegen, 1990; Witter et al., 1990).

Mentre la topografia setto-temporale sembra essere organizzata in una maniera graduale o secondo gradiente, l'organizzazione trasversale delle efferenze subicolari è notevolmente discontinua.

Lungo l'asse trasversale del subicolo possono essere differenziate tre popolazioni cellulari distinte rappresentanti la fonte di proiezioni nei confronti di specifici gruppi di strutture cerebrali. Questa organizzazione trasversale degli outputs del subicolo si può osservare lungo tutto il suo asse setto-temporale, sebbene sia chiaramente più evidente a livelli dorsali piuttosto che ventrali (Witter e Groenewegen, 1990; Witter et al., 1990).

Neuroni nel terzo prossimale del subicolo (i più vicini al campo CA1) proiettano alla corteccia infra- limbica, alla corteccia pre- limbica, alla corteccia peririnale, al nucleo *accumbens*, al setto laterale, al complesso amigdaloidico ed al nucleo ventro-mediale dell'ipotalamo. Queste proiezioni non originano esclusivamente dal subicolo, ma anche dall'adiacente terzo distale del campo CA1.

Cellule localizzate nel terzo centrale del subicolo proiettano in modo abbastanza selettivo ai nuclei mediali del talamo. Cellule situate nella

porzione subicolare più distale proiettano, invece, prevalentemente alla corteccia retrospleniale ed al pre-subicolo.

Le proiezioni subicolari alla corteccia entorinale ed al nucleo mammillare mediale non seguono una rigida organizzazione trasversale, poiché cellule situate in tutte le porzioni prossimo-distali del subicolo proiettano a queste aree.

Le porzioni prossimali del subicolo tendono a proiettare a porzioni più rostrali dei nuclei mammillari mediali, mentre le porzioni subicolari distali proiettano più caudalmente.

Una situazione simile si può ritrovare nelle proiezioni subicolari dirette alla corteccia entorinale. La metà prossimale del subicolo proietta alla suddivisione laterale della corteccia entorinale (cioè la parte che origina la componente laterale della via entorinale-ippocampale). La metà distale del subicolo proietta, invece, alla suddivisione mediale della corteccia entorinale (Witter e Groenewegen, 1990; Witter et al., 1990).

Posto che il terzo prossimale del subicolo dia origine a proiezioni nei confronti di numerose regioni corticali e sub-corticali, la domanda che sorge è se sia la stessa oppure siano diverse popolazioni cellulari ad innervare fibre a ciascuna struttura. Proiezioni dal terzo prossimale del subicolo al complesso settale, alla corteccia entorinale ed al complesso mammillare sembrano originare, almeno in parte, come collaterali in partenza da un singolo tipo di neuroni subicolari (Donovan e Wyss, 1983; Swanson et al., 1981).

## **5. CLASSIFICAZIONE NEUROCHIMICA DEGLI INTERNEURONI PRESENTI NELLA FORMAZIONE IPPOCAMPALE**

Il contenuto in neurotrasmettitori è una caratteristica utilizzata per la classificazione immunocistochemica dei neuroni. Il fatto che un neurone eserciti un effetto eccitatorio o inibitorio sul suo bersaglio dipende in larga parte dalla natura delle sostanze rilasciate dal suo terminale sinaptico, nonché dai recettori postsinaptici al quale il neurotrasmettitore si lega (Kuffler, 1960; Eccles, 1964).

Accanto al GABA, principale neurotrasmettitore ad effetto inibitorio, i neuroni esprimono selettivamente neuropeptidi (SOM, colecistochinina, VIP, NPY, enkefalina, sostanza P) (Hökfelt et al., 1980; Swanson, 1983) e proteine leganti il calcio (calbindina, parvalbumina, calretinina) (Celio, 1986, 1990; Baimbridge et al., 1992).

### **5.1. NEUROTRASMETTITORI CLASSICI**

#### **5.1.1. Interneuroni GABAergici**

L'acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) è il principale neurotrasmettitore utilizzato dagli interneuroni della formazione ippocampale.

Per identificare i neuroni GABAergici inizialmente vennero usati antisieri diretti verso l'enzima acido glutammico decarbossilasi (GAD) (Ribak et al., 1978) e successivamente divennero disponibili anche antisieri diretti verso il GABA.

Nella formazione ippocampale GAD e GABA sono stati individuati a livello di interneuroni (Ribak et al., 1978, 1981; Somogyi et al., 1983b;

Storm-Mathisen et al., 1983; Somogyi et al., 1985b). La proporzione dei neuroni GABAergici sulla popolazione neuronale totale varia secondo gli studi: 7% (Aika et al., 1994), 11% (Woodson et al., 1989), 10% (Freund e Buzsáki; 1996).

Tra i neuroni che mostrano immunoreattività per il GABA sono presenti interneuroni basket e cellule a candelabro.

La prima prova indiretta della natura GABAergica delle cellule basket deriva da esperimenti di immunoistochimica utilizzando antisieri diretti contro il GAD. I pirenofori (Ribak et al., 1978) ed i segmenti iniziali degli assoni (Somogyi et al., 1983b) delle cellule piramidali ippocampali e neocorticali (Freund et al., 1983) sono in rapporto con terminazioni assoniche GAD-positive formanti sinapsi simmetriche.

L'immunoreattività per il GABA a livello dei pirenofori delle cellule a candelabro è stata evidenziata in sezioni semisottili utilizzando il metodo di Golgi e procedure di immunocolorazione postembedding (Somogyi et al., 1985a). Tali risultati sono stati confermati da successivi studi utilizzando la tecnica dell'immunogold (Halasy e Somogyi, 1993a,b; Soriano e Frotscher, 1989; Halasy et al., 1996).

Oltre alle cellule basket e a candelabro, sono presenti altre popolazioni interneuronali che esprimono il GABA (Somogyi et al., 1984; Kosaka et al., 1985, 1988b; Tòth e Freund, 1992; Halasy e Somogyi, 1993a). Infatti risulta evidente che gli strati dendritici (strati radiato, oriens, molecolare e lacunoso-molecolare) della formazione ippocampale contengono un'elevata densità di terminazioni assoniche GABAergiche.

### 5.1.2. Interneuroni colinergici

L'acetilcolina (Ach) è presente in minor misura negli interneuroni ippocampali rispetto al GABA. Infatti l'enzima colina acetil-transferasi

(ChAT), coinvolto nella sintesi dell'Ach, è presente solo in pochi interneuroni GABAergici (Frotscher et al., 1986). La densità maggiore di cellule colinergiche si trova a livello dello strato lacunoso-molecolare del campo CA1 e negli strati dei granuli e molecolare del giro dentato. Tali cellule si presentano raramente nel campo CA3.

I neuroni ChAT-ir hanno corpi cellulari sferoidali o fusiformi di piccole dimensioni (10  $\mu\text{m}$ ). I neuroni presenti nello strato lacunoso-molecolare del campo CA1 hanno da 2 a 3 dendriti orizzontali ed almeno un dendrite maggiore che si estende sino allo strato piramidale; non sono presenti spine. Le cellule ChAT-positive presenti negli altri strati possiedono soprattutto alberi dendritici verticali simili a quelli della neocorteccia (Frotscher et al., 1986).

## **5.2. INTERNEURONI CONTENENTI PROTEINE LEGANTI IL CALCIO, NEUROPEPTIDI ED OSSIDO NITRICO**

### **5.2.1. Neuroni contenenti parvalbumina**

La presenza di parvalbumina (PV) nei neuroni GABAergici della corteccia cerebrale fu dimostrata per la prima volta da Celio (1986) e, successivamente, confermata a livello ippocampale da Kosaka et al. (1987).

Nella formazione ippocampale, la distribuzione dei pirenofori, dei dendriti e delle terminazioni assoniche di neuroni PV-ir mostra un pattern caratteristico.

Tutti i corpi cellulari, i quali sono generalmente più grandi rispetto a quelli di altri interneuroni, si trovano negli strati piramidale ed oriens dell'ippocampo propriamente detto e negli strati dei granuli e polimorfo del

giro dentato. Negli strati dove sono accolti i dendriti apicali delle cellule principali, i pirenofori PV-ir sono estremamente rari (Kosaka et al., 1987).

Nel giro dentato, più del 50% dei pirenofori si trova nello strato dei granuli, pochi di meno nello strato polimorfo e solamente un 2-3% nello strato molecolare. I dati quantitativi dei campi CA1 e CA3 sono simili. Più del 50% dei neuroni PV-ir si trovano nello strato piramidale, 30-40% nello strato oriens e solo un 3-6% nello strato radiato. Non sembrano essere presenti cellule PV-ir nello strato lacunoso-molecolare, sebbene lo strato lucido del campo CA3 contenga un numero piuttosto alto di neuroni PV-ir (7-10%) rispetto agli altri strati dendritici (Kosaka et al., 1987).

Nello strato oriens dei campi CA1 e CA3 i neuroni PV-ir rappresentano il 20-30% delle cellule GABAergiche, mentre nello strato polimorfo del giro dentato sono circa il 14-20% delle cellule GABAergiche. La loro percentuale a livello di strati dendritici è insignificante (Kosaka et al., 1987; Aika et al., 1994).

Essendo la maggioranza dei corpi cellulari PV-ir all'interno o adiacenti allo strato cellulare principale, essi rappresentano approssimativamente la metà dei neuroni GABAergici presenti in queste aree.

I dendriti delle cellule PV-ir si estendono lungo tutti gli strati della formazione ippocampale e sono paralleli ai dendriti dei neuroni principali (Kosaka et al., 1987; Sloviter, 1989; Celio, 1990; Nitsch et al., 1990b; Gulyàs et al., 1991b). L'aspetto generale dell'albero dendritico di molte cellule è a doppio cespuglio, con frequenti diramazioni vicine al pirenoforo.

Lo strato polimorfo del giro dentato e lo strato oriens dei campi CA1 e CA3 contengono, inoltre, un piccolo numero di neuroni multipolari PV-ir. Essi presentano dendriti obliqui che potrebbero non raggiungere gli strati contenenti i dendriti più distali delle cellule principali.

La maggior parte dei dendriti immunoreattivi per PV presenta delle varicosità, specialmente a livello di segmenti distali, ma non mostra spine.

Il segmento iniziale dell'assone dei neuroni che esprimono la PV origina dal pirenoforo o da un dendrite prossimale primario e può essere diretto verso i dendriti basali o apicali. Non è possibile seguire l'andamento degli assoni oltre il segmento iniziale a causa del sottile strato di mielina che prende origine molto vicino al pirenoforo (30-50  $\mu\text{m}$ ).

I terminali assonici PV-ir mostrano una caratteristica distribuzione laminare, infatti sono estremamente densi negli strati piramidale, dei granuli e nello strato oriens prossimale. Al contrario, non si rinviene praticamente alcuna terminazione assonica PV-ir negli strati dendritici (nello strato molecolare del giro dentato e negli strati radiato e lacunosomolecolare dei campi CA1 e CA3).

La caratteristica distribuzione laminare dei terminali assonici PV-ir coincide con quella delle cellule basket ed a candelabro, suggerendo che una o entrambe identifichino morfologicamente i tipi cellulari che contengono selettivamente questa proteina legante il calcio (Kawaguchi et al., 1987a,b).

Una prova evidente di tale nozione è stata fornita da Katsumaru et al. (1988b), il quale dimostrò che la maggior parte delle varicosità assoniche PV-positive forma sinapsi simmetriche con i pirenofori, i dendriti prossimali ed i segmenti assonici iniziali dei neuroni piramidali dei campi CA1 e CA3. Simili osservazioni sono state effettuate da Soriano et al. (1990) nel giro dentato.

Quindi considerati nell'insieme, tutti i neuroni PV-ir possono essere classificati come cellule basket o a candelabro (Kosaka et al., 1987; Katsumaru et al., 1988b, Sik et al., 1993), anche se non tutte le cellule basket e a candelabro esprimono PV (Nunzi et al., 1985; Gulyàs et al., 1991b; Acsàdy et al., 1996a,b).

### 5.2.2. Neuroni contenenti calbindina-D28k

Nella formazione ippocampale la calbindina-D28k (CB) è presente sia nelle cellule principali che negli interneuroni (Baimbridge e Miller, 1982; Baimbridge et al., 1982; Sloviter, 1989; Tòth e Freund, 1992).

Un'intensa immunoreattività per la CB è stata riscontrata nelle cellule dei granuli del giro dentato: i corpi cellulari, l'intero albero dendritico e gli assoni (fibre muschiate) di praticamente tutte le cellule dei granuli sono fortemente CB-ir. Con una certa frequenza si possono osservare cellule dei granuli in posizione anomala, spesso confuse con interneuroni, a livello di strato radiato del campo CA3 (Tòth e Freund, 1992).

Anche i neuroni piramidali del campo CA1 esprimono la CB (Baimbridge e Miller, 1982). Le cellule piramidali superficiali sono debolmente immunoreattive a livello di ippocampo propriamente detto dorsale, mentre sono maggiormente immunoreattive in quello ventrale. I loro assoni, formanti un plesso di fibre che decorrono orizzontalmente sino al confine tra strato oriens ed alveo, non sono CB-ir.

La CB viene espressa anche da alcuni interneuroni GABAergici: sembra infatti che il 10-20% delle cellule GABAergiche sia anche CB-ir (Tòth e Freund, 1992). La coesistenza della calbindina con le altre due proteine leganti il calcio è scarsa (Gulyàs et al., 1991b; Miettinen et al., 1992).

La maggior parte degli interneuroni CB-positivi presenti nel campo CA1 si trova a livello di terzo distale dello strato radiato, al confine con lo strato lacunoso-molecolare. Qualche interneurone CB-ir è presente a livello di strati oriens, piramidale e lacunoso-molecolare.

I pirenofori e i dendriti dei neuroni che esprimono la CB presenti nello strato radiato mostrano un'immunoreattività maggiore rispetto ai neuroni piramidali, per cui possono essere ben distinti nonostante si trovino

all'interno dello strato piramidale.

L'andamento dei processi dendritici degli interneuroni CB-ir è principalmente di tipo radiale: tali dendriti si possono estendere anche un millimetro senza abbandonare la parte di strato oriens al confine con l'alveo. La maggior parte di queste cellule contiene SOM.

Negli strati oriens e lacunoso-molecolare si possono osservare interneuroni che mostrano alberi dendritici orientati orizzontalmente.

I dendriti degli interneuroni CB-ir nello strato radiato, al confine con lo strato lacunoso-molecolare, si portano nello strato lacunoso-molecolare. Al contrario, i dendriti delle cellule orientate radialmente nello strato radiato decorrono orizzontalmente ad esso ma non sembrano estendersi in tale strato.

Gli assoni degli interneuroni CB-positivi sono difficili da visualizzare. In quei pochi esemplari con una soddisfacente immunomarcatura assonica sono state evidenziate arborizzazioni soprattutto nello strato radiato e oriens; raramente sono stati osservati assoni CB-positivi nello strato lacunoso-molecolare.

Neuroni CB-positivi sono presenti anche nel campo CA3. Il maggior numero di pironofori CB-positivi è presente nello strato radiato del campo CA3a-b, ma tali cellule sono anche comuni nello strato oriens. Il numero di neuroni CB-ir diminuisce gradualmente nel campo CA3c ed in corrispondenza dell'ilo del giro dentato. Il corpo cellulare di tali neuroni è multipolare e l'orientamento dendritico è radiale; i processi assonici presentano numerose varicosità e arborizzazioni nello strato radiato.

Nel campo CA3 sono presenti anche neuroni di grandi dimensioni dal soma triangolare che danno origine ad un segmento assonico che immediatamente viene rivestito da guaina mielinica ed entra nella sostanza bianca. Si pensa che tali cellule siano tra quelle che proiettano al setto mediale (Tòth e Freund, 1992).

Il giro dentato contiene uno scarso numero di interneuroni CB-positivi; all'interno dello strato dei granuli sono difficili da evidenziare a causa della forte immunoreattività delle cellule dei granuli. Nello strato molecolare il loro numero varia da 3 a 20 per ogni singola sezione coronale (60  $\mu\text{m}$ , ippocampo dorsale) e l'orientamento dendritico può essere sia orizzontale che verticale. Nello strato polimorfo sono in numero di 3-10 per sezione. Gli assoni degli interneuroni CB-positivi a livello di giro dentato non sono ancora stati indagati nei minimi dettagli da un punto di vista morfologico.

Gli interneuroni CB-ir situati negli strati radiato e oriens sono coinvolti nell'innervazione GABAergica dei dendriti delle cellule piramidali. I dati ultrastrutturali ottenuti sui pirenofori ed i dendriti dei neuroni CB-positivi sono alquanto limitati (Danos et al., 1991). Caratteristici di questi interneuroni sono il nucleo dentellato e un input sinaptico asimmetrico a livello di soma. La caratteristica che li distingue maggiormente dagli altri interneuroni è rappresentata dalla relativa rarità di contatti sinaptici lungo il loro albero dendritico.

In base alla distribuzione e alla localizzazione assonica e dendritica, gli interneuroni CB-positivi corrispondono alle cellule bistratificate, ad altre cellule presenti nello strato radiato e a neuroni orizzontali posti al confine fra strato radiato e lacunoso-molecolare (Freund e Buzsaki, 1996).

I neuroni O-LM, le cellule trilaminari ed i neuroni di proiezione posti nel campo CA1 sono risultati immunonegativi per la CB (Sik et al., 1995).

### 5.2.3. Neuroni contenenti calretinina

Differenti tecniche di immunohistochimica rivelano la presenza di numerosi interneuroni calretinina (CR)-ir in tutti gli strati del giro dentato e dell'ippocampo propriamente detto (Jacobowitz e Winsky, 1991; Gulyàs et al., 1992; Miettinen et al., 1992; Resibois e Rogers, 1992; Rogers, 1992).

Sulla base della morfologia dendritica (con spine o senza) e della distribuzione, i neuroni CR-ir possono essere distinti in due tipologie principali.

I neuroni immunoreattivi per la CR provvisti di spine sono presenti soprattutto dove vi è un'elevata densità di fibre muschiate (quindi a livello di strato polimorfo del giro dentato e nello strato lucido del campo CA3). I loro dendriti e, talvolta, i loro pirenofori mostrano numerose lunghe spine che si insinuano tra le fibre muschiate, le quali stabiliscono numerose (3-6) sinapsi con esse.

Nel giro dentato i dendriti dei neuroni CR-ir sono confinati nello strato polimorfo; nello strato lucido del campo CA3 decorrono parallelamente allo strato delle cellule piramidali e raramente vi entrano.

L'assone di tali neuroni non può essere visualizzato tramite tecniche di immunohistochimica, probabilmente a causa della sua mielinizzazione. Tuttavia i neuroni CR-ir nello strato lucido del campo CA3 sono stati studiati mediante iniezione intracellulare in vitro di biocytina. I loro assoni si portano principalmente allo strato lacunoso-molecolare del campo CA3, anche se sembrano raggiungere anche lo strato molecolare del giro dentato.

Le cellule CR-positive provviste di spine sembrano rappresentare un tipo cellulare di transizione, mostrando caratteristiche sia delle cellule HIPP dell'ilo del giro dentato sia delle cellule O-LM del campo CA3. Infatti i neuroni CR-ir sembrano innervare i dendriti dei neuroni piramidali e delle cellule dei granuli nella zona in cui terminano le afferenze della

corteccia entorinale.

Tuttavia è importante sottolineare che nello strato lacunosomolecolare l'inibizione esercitata dai neuroni CR-ir è di tipo feed-forward; ciò è in contrasto con il tipo di inibizione a livello di giro dentato e anche con l'inibizione esercitata dalle cellule HIPP e O-LM convenzionali.

La natura GABAergica delle cellule CR-ir provviste di spine rimane controversa. Neuroni di questo tipo, visualizzati sia con impregnazione mediante metodo di Golgi che mediante tecniche di immunistochemica, sembrano essere negative o scarsamente positive per il GABA (Miettinen et al., 1992; Soriano e Frotscher, 1993b). In ogni caso è necessario sottolineare che una colorazione negativa per il GABA del corpo cellulare non significa necessariamente che il neurone non sia GABAergico (Esclapez e Houser, 1995). Le cellule CR-positive provviste di spine potrebbero avere un'abbondante proiezione, il che spiegherebbe i bassi livelli di GABA nel pirenoforo. Tuttavia è stato osservato uno scarso numero di neuroni CR-positivi a livello di ilo del giro dentato che proietta per via commessurale (Miettinen et al., 1992).

I neuroni CR-ir privi di spine appartengono alle cellule IS (interneuron-selective). Il corpo cellulare dei neuroni IS si trova sia nel giro dentato (principalmente nello strato dei granuli e nel polimorfo) sia in tutti gli strati dell'ippocampo propriamente detto, soprattutto nel campo CA1. Gli alberi dendritici di queste cellule hanno un orientamento prevalentemente radiale. Alcune di queste cellule formano giunzioni dendro-dendritiche multiple con altre cellule CR-positive dello stesso tipo (Gulyàs et al., 1996).

Altri interneuroni orizzontali CR-immunoreattivi non appartenenti alla classe delle cellule IS sono presenti presso la fessura ippocampale. Secondo studi relativi allo sviluppo delle cellule contenenti proteine leganti il calcio, questi neuroni sembrerebbero corrispondere alle cellule di Cajal-

Retzius (Soriano et al., 1994).

Nello strato lacunoso-molecolare sono stati osservati tronchi assonici principali e sottili fibre provviste di varicosità, dall'orientamento prevalentemente orizzontale e di origine sconosciuta. La microscopia elettronica ha messo in evidenza come varicosità lungo questi assoni (GABA-negativi) stabiliscano sinapsi asimmetriche con dendriti o spine GABA-negative. Tali scoperte inducono a pensare che la maggior parte dei terminali assonici CR-positivi posti nello strato lacunoso-molecolare abbiano un'origine extraippocampale, rappresentata probabilmente dal nucleo *reuniens*. E' stato dimostrato, infatti, che tale nucleo talamico invia una proiezione specifica a questo strato e possiede un ampio numero di neuroni CR-positivi (Wouterlood et al., 1990; Jacobowitz e Winsky, 1991).

#### 5.2.4. Neuroni contenenti somatostatina

L'immunocolorazione per la SOM (SOM) permette di visualizzare un vasto numero di neuroni in tutte le sottoaree ippocampali, con una caratteristica distribuzione laminare (Köhler e Chan-Palay, 1982; Morrison et al., 1982; Johansson et al., 1984; Roberts et al., 1984; Somogyi et al., 1984; Bakst et al., 1986; Köhler et al., 1987; Sloviter e Nilaver, 1987; Kosaka et al., 1988b; Kunkel e Schwartzkroin, 1988; Milner e Bacon, 1989b; Leranth et al., 1990; Nitsch et al., 1990a; Finsen et al., 1992; Buckmaster et al., 1994). Studi di colocalizzazione hanno dimostrato che praticamente tutti i neuroni SOM-positivi presenti nell'ippocampo propriamente detto e nel giro dentato sono immunoreattivi per il GAD o comunque ne contengono l'mRNA (Somogyi et al., 1984; Kosaka et al., 1988b; Esclapez e Houser, 1995). Secondo Kosaka et al. (1988b), le cellule SOM-positive rappresentano il 14% di tutti i neuroni GAD-positivi nell'ippocampo propriamente detto, con valori lievemente superiori nel giro

dentato (16%) rispetto ai campi CA1 (12.5%) e CA3 (13%).

Giro dentato. Nel giro dentato i pirenofori SOM-positivi sono presenti nello strato polimorfo, in particolare a livello subgranulare, e nelle aree confinanti con lo strato radiato del campo CA3. Gli alberi dendritici di queste cellule sono scarsamente visibili mediante antisieri diretti verso la SOM. Tuttavia studi di marcatura intracellulare e immunocolorazione contro recettori associati agli interneuroni contenenti SOM (recettori mGluR1 e SP) sembrano indicare che i dendriti dei neuroni SOM-positivi del giro dentato sono confinato nell'ilo ed sono ricoperti da numerose spine.

Gli assoni degli interneuroni SOM-positivi mostrano una distribuzione laminare; nei due terzi più esterni dello strato molecolare è presente un importante plesso terminale, mentre sia il terzo più interno dello strato molecolare sia lo strato delle cellule dei granuli presentano un numero limitato di assoni a decorso radiale

La maggior parte delle collaterali assoniche presenti nello strato molecolare originano da neuroni ilari ipsilaterali (Bakst et al., 1986) anche se alcune provengono dall'ilo controlaterale (Bakst et al., 1986; Deller et al., 1995b). Inoltre le collaterali assoniche possono anche derivare dai neuroni del campo CA1 controlaterale, in quanto sono anche stati visualizzati assoni che oltrepassano la fessura ippocampale (Bakst et al., 1986). Gli interneuroni SOM-ir formano sinapsi asimmetriche a livello di dendriti delle cellule dei granuli (Leranth et al., 1990).

I dendriti SOM-positivi sono provvisti di spine e ricevono numerose sinapsi asimmetriche dalle terminazioni delle fibre muschiate, sia lungo l'albero dendritico che sulle spine stesse (Leranth e Frotscher, 1987).

Sulla base della caratteristica localizzazione somatica e della distribuzione dendritica ed assonica, si suppone che le cellule ilari SOM-positive siano cellule HIPP.

Ippocampo propriamente detto. Nel campo CA1 i neuroni SOM-ir si

trovano principalmente nello strato oriens; nello strato piramidale il numero sono scarsi e assenti strati radiato e lacunoso-molecolare. Nel campo CA3 sono più numerosi e presenti negli strati piramidale, lucido e radiato prossimale.

I dendriti dei neuroni SOM-positivi nel campo CA1 decorrono orizzontalmente e sono confinati in una sottile zona al confine tra alveo e strato oriens. Nel campo CA3 le cellule SOM-positive presentano un albero dendritico multipolare che penetra tutti gli strati eccetto il lacunoso-molecolare (Baude et al., 1993; Blasco-Ibanez e Freund, 1995).

Il maggiore input eccitatorio diretto alle cellule SOM-positive deriva da neuroni piramidali (nel ippocampo) e da cellule dei granuli (nel giro dentato) (Blasco-Ibanez e Freund, 1995).

Il terminali assonici SOM-ir si trovano prevalentemente a livello di strato lacunoso-molecolare dove contraggono sinapsi simmetriche principalmente con cellule piramidali (Sik et al., 1995; Katona et al., 1996).

I dendriti SOM-ir ricevono sinapsi GABAergiche asimmetriche (da collaterali delle cellule piramidali del campo CA1) e simmetriche (da interneuroni VIP-ir).

La maggioranza dei neuroni CB-ir localizzati al confine tra alveo e strato oriens esprime anche SOM (Katona et al., 1996).

Nel campo CA1 le cellule SOM corrispondono alle cellule O-LM orizzontali, mentre nel campo CA3 corrispondono alle cellule LM proiettanti con un albero dendritico multipolare.

#### 5.2.5. Neuroni contenenti Neuropeptide Y

La natura GABAergica dei neuroni ippocampali contenenti neuropeptide Y (NPY) non è mai stata studiata direttamente. Ad ogni modo, la coesistenza di NPY con SOM ed altri markers presenti

esclusivamente in neuroni GABAergici prova che i neuroni NPY-positivi contengono GABA.

La distribuzione generale delle cellule immunoreattive per il NPY è molto simile a quella dei neuroni SOM-positivi, ma vi sono anche importanti differenze (Chronwall et al., 1985; de Quidt e Emson, 1986; Köhler et al., 1986, 1987; Deller e Leranth, 1990; Milner e Veznedaroglu, 1992).

Giro dentato. La maggioranza dei neuroni immunoreattivi per il NPY si trova nell'ilo (neuroni fusiformi) e nello strato subgranulare (neuroni piramidali); un piccolo numero di cellule NPY-ir è presente anche nello strato molecolare (neuroni grandi e multipolari).

I processi dendritici dei neuroni presenti nell'ilo, analogamente a quanto avviene con le cellule SOM-positive, non raggiungono lo strato molecolare. I dendriti apicali dei neuroni presenti a livello piramidale invece attraversano lo strato molecolare sino a raggiungere la fessura ippocampale o la superficie piaie. Tale gruppo differisce in maniera evidente dai neuroni contenenti SOM ma è simile alle cellule parvalbumina- e colecistochinina-positive.

Le cellule ilari NPY-positive con arborizzazioni dendritiche ilari (il tipo a SOM) rappresentano la maggioranza (60-70%) delle cellule NPY-positive presenti nel giro dentato (cellule di tipo 1 e 2 di Köhler et al., 1987; Deller e Leranth, 1990). Le cellule "piramidali a canestro" e le cellule multipolari dello strato molecolare rappresentano rispettivamente il 20% e il 7% delle cellule contenenti NPY del giro dentato (cellule di tipo 3 e 4 di Deller e Leranth, 1990).

I terminali assonici NPY-ir formano un plesso a livello del terzo più esterno dello strato molecolare (come gli assoni SOM-positivi). La densità di terminazioni è moderatamente elevata all'interno dello strato delle cellule dei granuli ed ancora più alta nell'ilo (Köhler et al., 1987; Deller e Leranth,

1990). Alcune fibre NPY-ir sembrano derivare dai neuroni siti nell'ilo controlaterale.

A livello di processi dendritici NPY-ir sono presenti numerose sinapsi asimmetriche, la maggior parte delle quali sembra originare dalle fibre muschiate; alcune originano dalla corteccia entorinale e dalla via associativa-commissurale (Deller e Leranath, 1990).

Le terminazioni assoniche NPY-positive formano sinapsi in tutti gli strati con i corpi cellulari ed i dendriti di cellule muschiate e cellule dei granuli (Deller e Leranath, 1990; Milner e Veznedaroglu, 1992).

La corrispondenza tra i neuroni contenenti NPY e le cellule morfologicamente identificate è piuttosto complessa. Le cellule ilari SOM-positive sembrano rappresentare cellule HIPP e tipi particolari di cellule basket che ricevono un'innervazione preponderante da parte delle fibre muschiate dell'ilo.

Ippocampo propriamente detto. La maggior parte dei neuroni NPY-positivi presenti nel campo CA1 è localizzata negli strati oriens e piramidale. Piccoli gruppi di cellule sono stati riscontrati anche nello strato radiato. Negli strati oriens, piramidale, lucido e radiato prossimale del campo CA3 la densità cellulare è piuttosto uniforme. Lo strato lacunosomolecolare non contiene corpi cellulari NPY-positivi.

I dendriti di alcune cellule NPY-positive di aspetto fusiforme ed orientate orizzontalmente si arborizzano principalmente nello strato oriens, mentre altri tipi morfologici, in particolare quelli localizzati nel campo CA3, possono avere un albero dendritico multipolare.

Le terminazioni assoniche NPY-positive sono presenti in tutti gli strati e formano sinapsi simmetriche con alberi dendritici e rari pirenofori di cellule piramidali. Sono presenti numerosi terminali NPY-positivi che derivano da proiezioni adrenergiche provenienti dal *locus coeruleus* (Gulyàs et al., 1993b; Sik et al., 1995).

I neuroni NPY-ir che esprimono anche SOM rappresentano cellule O-LM (40-60% di tutte le cellule NPY-positive nel campo CA1 (Köhler et al., 1987).

#### 5.2.6. Neuroni contenenti colecistochinina

La colecistochinina (CCK) è presente a livello cerebrale prevalentemente in forma di octapeptide, ed antisieri sviluppati contro tale sequenza sono stati ampiamente impiegati per visualizzare gli elementi contenenti colecistochinina-immunoreattivi in varie aree dell'encefalo, formazione ippocampale compresa (Greenwood et al., 1981; Handelsmann et al., 1981; Harris et al., 1985; Kosaka et al. 1985; Nunzi et al., 1985; Sloviter e Nilaver, 1987; Gulyàs et al., 1991b).

I neuroni immunoreattivi per la CCK si riscontrano in tutti gli strati e le aree dell'ippocampo propriamente detto e del giro dentato; hanno morfologia non piramidale e sono immunoreattivi per il GAD ed il GABA (Somogyi et al., 1984; Kosaka et al., 1985). I neuroni GABAergici contenenti CCK rappresentano approssimativamente il 10% di tutte le cellule GABA-ir ippocampali; le cellule CCK-positive sono più numerose nel campo CA1 (12.5%) che nel campo CA3 o nel giro dentato (10% e 9% rispettivamente (Kosaka et al., 1985).

Giro dentato. La maggior parte dei neuroni CCK-ir presenti nel giro dentato si trova nello strato dei granuli o in zona subgranulare. Essi hanno un soma di forma piramidale, un dendrite apicale principale che decorre verso la superficie piaie e dendriti basali che penetrano all'interno dell'ilo. In questo le cellule CCK-ir ricevono input sia dalla via perforante che dalle collaterali locali delle fibre muschiate.

Le terminazioni assoniche formano una densa banda nella parte più superficiale dello strato delle cellule dei granuli e nell'adiacente zona dello

strato molecolare; anche la parte profonda dell'ilo contiene un numero piuttosto elevato di terminazioni, molte delle quali circondano pirenofori non immunoreattivi.

Nell'ilo i dendriti di queste cellule ricevono numerose sinapsi da terminazioni delle fibre muschiate; i dendriti posti nello strato molecolare, invece, prendono rapporto sia con sinapsi simmetriche che asimmetriche (Leranth e Frotscher, 1986).

I terminali assonici CCK-ir presenti nello strato dei granuli e nell'adiacente parte dello strato molecolare stabiliscono contatti sinaptici simmetrici multipli con i corpi cellulari ed i dendriti delle cellule dei granuli; a livello di ilo invece con cellule muschiate (Leranth e Frotscher, 1986).

I neuroni CCK-ir sembrano rappresentare cellule basket provviste di processi assonici nella porzione superiore dello strato delle cellule dei granuli e nello strato polimorfo.

Ippocampo propriamente detto. Nei campi CA1 e CA3 la distribuzione dei neuroni immunoreattivi per la CCK è complementare rispetto a quella delle cellule SOM- e NPY-positive. Tali cellule sono presenti in gran numero nello strato radiato, meno frequentemente negli strati piramidale ed oriens e solo saltuariamente nello strato lacunosomolecolare.

Sia nel campo CA1 che in quello CA3, le aree di terminazione degli assoni dei neuroni CCK-ir sono limitate agli strati piramidale e radiato prossimale, dove circondano i pirenofori ed i dendriti prossimali delle cellule piramidali.

Le terminazioni assoniche CCK-positive formano sinapsi simmetriche con i corpi cellulari delle cellule piramidali; occasionalmente possono stabilire contatti sinaptici con i corpi cellulari ed i dendriti di altri interneuroni (Harris et al., 1985; Nunzi et al., 1985).

In base al comportamento delle terminazioni assoniche, tutti i neuroni immunoreattivi per la CCK possono essere classificati come cellule basket.

#### 5.2.7. Neuroni contenenti il peptide vasoattivo intestinale (VIP)

Nel giro dentato e nell'ippocampo propriamente detto, sono state ampiamente studiate la distribuzione, la connettività sinaptica e l'immunoreattività al GABA dei neuroni immunoreattivi per il peptide vasoattivo intestinale (VIP) (Loren et al., 1979; Sims et al., 1980; Köhler, 1982, 1983; Leranth et al., 1984; Roberts et al., 1984; Sloviter e Nilaver, 1987; Acsàdy et al., 1996a,b; Hájos et al., 1996).

Le cellule VIP-ir sono presenti in tutti gli strati e sottoregioni del giro dentato e dell'ippocampo propriamente detto; tutte le cellule VIP-positive mostrano immunoreattività per il GABA (Acsàdy et al., 1996a,b; Hájos et al., 1996).

Giro dentato. Le cellule VIP-positive sono presenti in tutti gli strati del giro dentato, anche se nello strato dei granuli e nella zona adiacente ad esso il loro numero sembra essere leggermente maggiore.

La morfologia e la distribuzione laminare dei dendriti sono estremamente variabili. Il tipo più frequente di cellula VIP-positiva presenta un albero dendritico con orientamento prevalentemente radiale. Tali dendriti originano dai corpi cellulari posti nella parte più interna dello strato molecolare. Sono anche presenti neuroni nella parte più interna dell'ilo che presentano dendriti multipolari che raggiungono lo strato molecolare.

Il maggior numero di terminazioni assoniche VIP-ir si trova a livello di ilo e origina da cellule (probabilmente neuroni basket) collocate nello strato molecolare più interno. Un minor numero di collaterali VIP-positive

è stato osservato nello strato molecolare, dove formano sinapsi con corpi cellulari o dendriti prossimali di altri interneuroni (Hajós et al., 1996). Le terminazioni assoniche immunoreattive per il VIP formano sinapsi simmetriche con i pirenofori ed i dendriti delle cellule dei granuli. I neuroni che proiettano all'ilo innervano prevalentemente interneuroni GABAergici. La maggior parte degli elementi postsinaptici delle cellule VIP-positive che proiettano allo strato molecolare sembrerebbero essere altri interneuroni.

Le cellule basket VIP-ir contengono la CCK ma non la calretinina; al contrario, i neuroni VIP-positivi che proiettano all'ilo sono reattivi per la calretinina ma non per la CCK (Hajós et al., 1996). Le cellule VIP-positive che proiettano all'ilo innervano prevalentemente le cellule musciate (Leranth e Frotscher, 1986), mentre le cellule VIP- e calretinina- positive mostrano proiezioni ilari che innervano prevalentemente gli interneuroni GABAergici. In questa regione, le cellule basket VIP-ir rappresentano solo una piccola parte delle cellule a canestro CCK-positive (Gulyàs et al., 1991b; Acsàdy et al., 1996a).

Ippocampo propriamente detto. I neuroni VIP-positivi sono presenti in tutti gli strati dei campi CA1 e CA3, anche se il numero maggiore si trova negli strati piramidale, lacunoso-molecolare e radiato.

I pirenofori sono relativamente piccoli e fusiformi, mentre l'orientamento dendritico è prevalentemente verticale. Gli alberi dendritici delle cellule presenti negli strati piramidale, radiato ed oriens sono per lo più bipolari o a doppio ciuffo, e la maggioranza sembra diffondersi in tutti gli strati. Gli alberi dendritici che originano da corpi cellulari di grandi dimensioni posti nello strato piramidale non raggiungono lo strato lacunoso-molecolare.

Nell'ippocampo propriamente detto si possono osservare tre tipi principali di collaterali assoniche, ognuna originante da differenti neuroni VIP-positivi (Acsàdy et al., 1996a,b). Il primo tipo innerva le cellule O-LM

orizzontali poste al confine tra alveo e strato oriens, mentre il secondo forma contatti multipli con gli interneuroni nello strato radiato. Entrambe le tipologie neuronali sono CR-ir e CCK-negative. Il terzo tipo di cellula VIP-ir origina terminazioni assoniche che si portano nello strato piramidale, dove vanno a circondare i pirenofori dei neuroni piramidali. Queste cellule sono CCK-ir e CR-negative.

I terminali assonici VIP-positivi presenti nello strato piramidale stabiliscono sinapsi simmetriche con i corpi cellulari ed i dendriti prossimali di neuroni piramidali (Acsàdy et al., 1996a,b).

Quindi, dal punto di vista morfologico e neurochimico, i neuroni ippocampali VIP-positivi sono di tre tipi distinti, uno dei quali è la cellula basket CCK-positiva e PV-negativa. Tale osservazione conferma che esistono almeno due differenti tipi neurochimici di cellule basket: uno contenente la CCK ed il VIP e l'altro PV-ir. I rimanenti due tipi di cellule VIP-positive non prendono contatto con le cellule piramidali, ma innervano altri interneuroni.

#### 5.2.8. Neuroni contenenti encefaline

Neuroni immunoreattivi per leu- e met-enkefalina (ENK) sono stati visualizzati e descritti dettagliatamente nella formazione ippocampale di ratto (Gall et al., 1981). L'immunoreattività non è limitata agli interneuroni ma è anche presente nelle cellule dei granuli del giro dentato (Gall, 1986). Interneuroni ENK-positivi sono presenti principalmente negli strati radiato e piramidale dell'ippocampo propriamente detto. Tali cellule presentano un soma fusiforme e mostrano alberi dendritici che decorrono prevalentemente paralleli ai dendriti delle cellule piramidali.

Un altro gruppo di interneuroni ENK-positivi si trova al confine tra lo strato radiato e lo strato lacunoso-molecolare; tali cellule mostrano

dendriti orizzontali od obliqui che decorrono principalmente nello strato lacunoso-molecolare.

Terminali assonici VIP-positivi sono presenti soprattutto a livello di strato lacunoso-molecolare dei campi CA1 e CA3 e nel terzo più esterno dello strato molecolare del giro dentato.

I neuroni ENK-positivi presenti nel campo CA1 contengono GABA e VIP; tuttavia solo un sottogruppo di cellule VIP- positive (quelle che innervano gli interneuroni dello strato radiato) è immunoreattivo per l'ENK.

In conclusione, i neuroni contenenti ENK rappresentano un sottogruppo di cellule VIP-positive che innervano selettivamente altri interneuroni presenti negli strati radiato ed oriens. Esse possiedono un albero dendritico che si estende in tutti gli strati o si arborizza principalmente nello strato lacunoso-molecolare.

#### 5.2.9. Neuroni contenenti le neurochinine

Nei neuroni ippocampali di ratto e scimmia è stata evidenziata la sostanza P (SP) (Ljungahl et al., 1978; Roberts et al., 1984; Davies e Köhler, 1985; Iritani et al., 1989). L'immunoreattività per SP è estremamente limitata ad assoni provvisti di varicosità. Nei campi CA3 e CA1 tali assoni si trovano al confine dell'ilo, nello strato granuloso e nello strato piramidale. Nei campi CA2 e CA3 essi sono particolarmente addensati negli strati piramidale, radiato ed oriens.

Gli assoni intensamente colorati presenti nei campi CA2 e CA3a hanno probabilmente un'origine estrinseca; sembra che essi raggiungano tali aree attraverso la via fimbria-fornice. Assoni di origine locale sono più frequenti all'interno o in prossimità degli strati piramidale e dei granuli, dove formano sinapsi simmetriche (Seress e Leranth, 1996). La maggior

parte di queste cellule corrisponde agli interneuroni SOM-ir presenti nell'ilo del giro dentato.

La neurochinina B (NKB) è presente in un numero ridotto di interneuroni ippocampali. Alla base dello strato delle cellule dei granuli, corpi cellulari di grandi dimensioni e di forma piramidale risultano spesso immunoreattivi per la NKB. Nel campo CA1, cellule NKB-ir possono essere visualizzate negli strati piramidale, radiato e lacunoso-molecolare. Una debole immunoreattività per la NKB è presente anche nelle fibre muschiate (Marksteiner et al., 1992).

#### 5.2.10. Neuroni nitregici

L'ossido nitrico (NO) è un gas solubile sia in acqua che nei lipidi, in grado di diffondere liberamente attraverso le membrane cellulari e lo spazio extracellulare. Esso, mediante la regolazione della sintesi di cGMP, esercita un effetto modulatore sia a breve che lungo termine (Garthwaite, 1991; Snyder, 1992). Esistono tre isoforme di ossido nitrico sintasi (NOS): neuronale o di tipo I (nNOS), inducibile o di tipo II (iNOS) ed endoteliale o di tipo III (eNOS) (Paakkari e Lindsberg, 1995).

Nella formazione ippocampale, l'isoforma endoteliale è localizzata nelle cellule piramidali (Dinerman et al., 1994), mentre quella neuronale sembra essere limitata agli interneuroni; questi ultimi sono NADPH-diaphorase-positivi (Hope et al., 1991; Vincent e Kimura, 1992; Valtschanoff et al., 1993; Dun et al., 1994). E' interessante notare che tutti i neuroni che mostrano reattività per NADPH-diaforasi sono anche immunoreattivi per GABA, fornendo così una prova diretta della loro natura di interneuroni (Valtschanoff et al., 1993).

Giro dentato. Nel giro dentato gli interneuroni nNOS-ir sono particolarmente abbondanti nell'ilo, in zona subgranulare e all'interno dello

strato dei granuli (Valtschanoff et al., 1993). Le cellule presenti nella parte profonda dell'ilo mostrano solitamente corpi cellulari di grandi dimensioni, con processi dendritici che raramente penetrano nello strato dei granuli.

Cellule dello strato polimorfo di grandi dimensioni poste e al confine con lo strato delle cellule dei granuli mostrano le tipiche caratteristiche morfologiche delle cellule basket. Esse presentano un dendrite apicale principale che attraversa lo strato molecolare e diversi dendriti basali.

Le cellule nello strato dei granuli hanno corpi cellulari più piccoli (fusiformi o piramidali) ed un dendrite apicale che decorre radialmente. I dendriti basali emergono dal soma e decorrono nella zona polimorfa subgranulare, staccando solo un limitato numero di ramificazioni.

I terminali assonici sono evidenti soprattutto nello strato molecolare, specialmente nei due terzi più esterni. Sottili assoni principali originanti da cellule nNOS-positive presenti nel campo CA1 spesso attraversano la fessura ippocampale per terminare nell'ilo del giro dentato dentato (Sik et al., 1994).

Ippocampo propriamente detto. Nei campi CA1 e CA3 sono presenti numerosi neuroni nNOS-ir soprattutto negli strati radiato e piramidale; un numero inferiore è presente nello strato oriens ed in minor misura in quello lacunoso-molecolare.

Alcuni corpi cellulari nNOS-ir sono piccoli (10-15  $\mu\text{m}$  di diametro), fusiformi o sferoidali, e mostrano alberi dendritici orientati in senso radiale. Tali cellule sono molto numerose nello strato radiato dei sottocampi CA3a e CA3b, nello strato oriens al confine tra i campi CA3a e CA2 e nello strato radiato di quello CA1, vicino al confine subicolare.

Alcuni neuroni nNOS-ir mostrano corpi cellulari di grandi dimensioni (20-35  $\mu\text{m}$  di diametro) localizzati prevalentemente nello strato radiato, al confine con lo strato lacunoso-molecolare. Tali cellule si trovano tipicamente nelle vicinanze del limite subicolare. Un'altra localizzazione

comune di queste cellule è lo strato oriens del campo CA1, dove esse presentano dendriti decisamente orizzontali.

Dense arborizzazioni assoniche nNOS-ir sono visibili nello strato lacunoso-molecolare e nella parte distale dello strato radiato. Fatta eccezione per il tronco assonico principale (che solitamente decorre radicalmente) tutte le collaterali hanno un decorso prevalentemente orizzontale e sono provviste di numerose varicosità (Sik et al., 1994).

Nel giro dentato, la maggior parte (95%) dei neuroni contenenti la SOM si sono anche rivelati immunoreattivi anche per il NOS. Nella stessa regione, solo una quantità insignificante (5%) di cellule PV-positive presentano immunoreattività per l'NOS (Dun et al., 1994; Dàvila et al., 1995). Cellule NOS-positive presenti alla base dello strato delle cellule dei granuli presentano corpi cellulari di forma piramidale e dendriti apicali principali che penetrano all'interno dello strato molecolare. Queste cellule non sono mai immunoreattive per la SOM. Sebbene esse mostrino caratteristiche morfologiche tipiche delle cellule basket piramidali, non esprimono la PV.

Nell'ippocampo propriamente detto la corrispondenza tra gruppi cellulari contenenti NOS ed altri gruppi definiti in base alle loro caratteristiche neurochimiche è meno chiara. La maggior parte delle cellule SOM- e PV-ir presenti nello strato oriens dei campi CA1 e CA2 sembrano essere negative per l'NOS (Dun et al., 1994; Dàvila et al., 1995).

Non essendoci dati disponibili riguardo alla coesistenza di NOS con altri neuropeptidi e proteine leganti il calcio, si può solo ipotizzare l'identità di queste cellule basandosi sulla morfologia e la distribuzione laminare. Le cellule NOS-positive di grandi dimensioni (presenti nella parte distale dello strato radiato, nello strato piramidale, e nello strato oriens) potrebbero corrispondere ad un sottogruppo di cellule NPY-positive che proiettano principalmente allo strato lacunoso-molecolare. I loro assoni possono

attraversare la fessura ippocampale per terminare nel giro dentato. Le cellule fusiformi di piccole dimensioni localizzate negli strati radiato e piramidale potrebbero corrispondere a diversi tipi di interneuroni contenenti VIP, CR, CCK e CB.



## **Parte seconda**



## **6. SCOPO DELLA RICERCA**

Parvalbumina, calbindina-D28k e calretinina appartengono alla famiglia omologa delle EF-hand, un gruppo di proteine leganti il calcio che gioca un ruolo importante nella regolazione della concentrazione del calcio intracellulare nelle cellule di vari tessuti, compreso quello nervoso (Celio, 1990; Gulyàs et al., 1996; DeFelipe, 1997).

La formazione ippocampale riveste un ruolo di grande importanza nel controllo delle funzioni cognitive (Eichenbaum, 2001) e rappresenta una delle regioni più vulnerabili ai processi di invecchiamento (Mesulam, 1999; Miller e O'Callahan, 2005).

Il processo dell'invecchiamento è caratterizzato ed accompagnato da numerosi cambiamenti fisiologici e comportamentali, associati a processi degenerativi a carico dei diversi sistemi organici. Il cane è spesso utilizzato come modello animale per investigare patologie umane; questo è possibile poiché più di 400 malattie del cane sono fenotipicamente simili a quelle riscontrate nell'Uomo (Cummings et al., 1996; Rofina et al., 2003; Pugliese et al.; 2004). In particolare il cane è un ottimo modello di ricerca per l'invecchiamento, l'ischemia generalizzata e la demenza senile (Rosenthal et al., 1992; Perry et al., 1994; Head et al., 2002).

Nonostante siano stati condotti diversi studi sull'espressione età-dipendente delle proteine leganti il calcio nel sistema nervoso (SN) in varie specie (Armbrecht et al., 1999; Choi et al., 2008; Molinari et al., 1996; Potier et al., 1994; Pugliese et al., 2004; Sisó et al., 2003; Villa et al., 1994; Yang et al., 2008), vi sono pochi studi sul cane.

L'obiettivo di questo studio è stato, quindi, quello di valutare le caratteristiche morfologiche e la distribuzione dell'immunoreattività per le

proteine leganti il calcio nella formazione ippocampale di cane; in aggiunta, alcuni aspetti morfometrici e neurochimici dell'ippocampo di cani giovani (gruppo 1; età compresa tra 1 e 3 anni) sono state comparate con quelle di cani vecchi (gruppo 2; età superiore ai 10 anni) al fine di evidenziare eventuali differenze correlate con l'età.

Lo studio è stato svolto in parte utilizzando sezioni di encefalo, sulle quali sono state applicate tecniche istologiche ed immunoistochimiche, e in parte analizzando risonanze magnetiche di cani risultati esenti da alterazioni morfologiche dell'encefalo.

In tutti i cani sono stati analizzati i seguenti aspetti:

- Organizzazione anatomica della formazione ippocampale e valutazione dello spessore degli strati delle singole strutture (giro dentato, ippocampo propriamente detto e subicolo) che la costituiscono. Per tale scopo sono state analizzate le sezioni colorate con le tecniche di istologia classica (colorazione con la tionina).
- Valutazione dell'espressione di alcune proteine leganti il calcio (parvalbumina, calbindina D-28k, calretinina), utilizzando tecniche di immunoperossidasi. Per ciascuna proteina sono state osservate le caratteristiche di distribuzione della loro immunoreattività all'interno delle diverse aree della formazione ippocampale (giro dentato, ippocampo propriamente detto, subicolo). Mediante questa analisi sono state valutate, in particolare, la distribuzione, la morfologia e l'area dei neuroni esprimenti le differenti proteine leganti il calcio. In aggiunta, è stata osservata l'intensità di marcatura e la distribuzione dell'immunoreattività del neuropilo.
- Comparazione tra le caratteristiche anatomiche della formazione ippocampale di soggetti giovani e vecchi. Tale analisi è stata fatta prendendo in considerazione, nelle sezioni colorate con tionina, lo spessore delle strutture costituenti la formazione ippocampale (giro

dentato, ippocampo propriamente detto e subicolo), nonché lo spessore dei singoli strati di ciascuna struttura. Nelle sezioni sottoposte alla reazione dell'immunoperossidasi, è stato valutato, per ciascuna struttura ed in ciascun strato, il numero totale di neuroni immunoreattivi per ciascuna proteina legante il calcio, comparando i dati ottenuti nei soggetti giovani con quelli dei soggetti vecchi.

- Analisi della formazione ippocampale alla risonanza magnetica focalizzando l'attenzione su un'eventuale riduzione di volume di tale struttura nei soggetti vecchi. In particolare, è stata misurata l'altezza delle formazioni ippocampali destra e sinistra comparandola con il diametro dorso-ventrale dell'encefalo; tali misurazioni sono state fatte al medesimo livello, ovvero nell'immagine trasversale FLAIR nella quale erano presenti sia i collicoli rostrali sia l'acquedotto del mesencefalo.



## 7. MATERIALI E METODI

### 7.1 Istologia classica e immunoperossidasi

#### 7.1.1 Campionamento e processazione del campione

Per tale studio sono stati prelevati gli encefali di 5 soggetti appartenenti a razze diverse: 2 cani giovani (< 3 anni) e 3 anziani (> 10 anni) (Tabella1). I cani sono stati soppressi per patologie non-neurologiche ed i prelievi sono stati eseguiti entro 2 ore dal decesso.

**Tabella 1.** Soggetti utilizzati per le indagini istologiche ed immunoistochimiche.

	Razza	Età	Sesso	Patologia
CN 1	Bulldog francese	3 mesi	F	Sospetta malformazione Chiari-like e siringomielia
CN2	Setter inglese	15 anni	M	Incontinenza
CN3	Husky	14 anni	M	Glaucoma bilaterale
CN4	Setter inglese	2 anni	F	Frattura traumatica della colonna vertebrale
CN5	Cairn terrier	15 anni	F	Diabete scompensato

Il materiale prelevato è stato subito fissato in paraformaldeide al 4%, pH 7.4, per 48-72ore a 4°C. Dopo tre lavaggi in PBS (*fosfato buffer solution*: 0.15 M NaCl in 0.01 M sodio fosfato, pH 7.4) a 4°C, effettuati nell'arco di 24 ore, il materiale è stato conservato in una soluzione di PBS contenente sodio-azide allo 0.1% e saccarosio al 30% e posto in frigorifero (4°C). Da ciascun encefalo sono state isolate le formazioni ippocampali, destra e sinistra, che in seguito sono state tagliate, in senso rostro-caudale, al microtomo congelatore in sezioni coronali di 40 µm di spessore. Le sezioni sono state raccolte e quindi poste in modo seriato in 4 contenitori (A, B, C, D) da 24 pozzetti ciascuno (A1-A6; B1-B6; C1-C6; D1-D6):

- A: sezioni utilizzate per la colorazione con tionina.
- B: sezioni utilizzate per le reazioni di immunoperossidasi (parvalbumina).

- C: sezioni utilizzate per la reazioni di immunoperossidasi (calbindina D-28k).
- D: sezioni utilizzate per la reazioni di immunoperossidasi (calretinina).

Le sezioni destinate alla colorazione con tionina sono state poste in formalina al 10%, mentre quelle destinate alle reazioni di immunoperossidasi sono state conservate a +4°C in un'opportuna soluzione di stoccaggio (soluzione di PBS contenente sodio-azide allo 0.1% e saccarosio al 30%).

### 7.1.2 Colorazione con la tionina

Tutte le sezioni del contenitore A sono state colorate con la tionina. Le sezioni, una volta distese sui vetrini gelatinizzati, sono state immerse in una soluzione costituita dal 50% di alcool 100° e dal 50% di cloroformio per un'ora. In seguito, al fine di essere idratate, le sezioni sono state poste nei seguenti alcoli: 100° (4 minuti), 95° (2 minuti), 70°(2 minuti) e 50°(2 minuti); infine, per raggiungere la completa idratazione sono state poste, infine, in acqua distillata (2 minuti). In seguito i vetrini sono stati immersi nella soluzione di tionina per circa 30 minuti; al termine di tale procedimento sono stati disidratati mediante passaggi successivi in alcoli 50° (2 minuti), 70°(2 minuti), 95°(2 minuti) e 100°(3 minuti) e quindi immersi in xilolo (10 minuti). Infine, i preparati sono stati chiusi con opportuna resina (Entelan) e vetrino coprioggetto.

### 7.1.3 Immunoperossidasi

Le sezioni sono state sottoposte alla reazione dell'immunoperossidasi, utilizzando degli specifici anticorpi primari monoclonali, per evidenziare l'espressione di tre proteine leganti il calcio: parvalbumina, calbindina D-28k e calretinina. Per questa analisi, in particolare, sono state impiegate tutte le sezioni del contenitore B (per evidenziare la parvalbumina), del contenitore C (per evidenziare la calbindina-D28k) e del contenitore D (per evidenziare la calretinina). Tutte le operazioni sono state eseguite su sezioni *free-floating*. Le sezioni sono state raccolte dalla soluzione di stoccaggio e lavate in PBS 0.01 M (3x10 minuti). Per eliminare l'attività delle perossidasi endogene, le sezioni sono state quindi trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> all'1% in PBS per 15 minuti, dopodiché sono state risciacquate in PBS 0.01 M con 6 passaggi da 5 minuti ciascuno. Per ridurre le reazioni non specifiche, le sezioni sono state quindi incubate in una soluzione contenente Normal Goat Serum al 10% (Colorado Serum Co., Denver, CO #CS 1324) e Triton X-100 allo 0.5% in PBS 0.01 M per 2 ore a temperatura ambiente. Quindi le sezioni sono state incubate in una soluzione contenente l'anticorpo monoclonale specifico, Triton X-100 allo 0.5% e Normal Goat Serum (Colorado Serum Co., Denver, CO #CS 1324) all'1%, per 48 ore a +4°C. Come sostanza diluente è stato utilizzato "antibody diluent" (1.8% NaCl in una soluzione 0.01 M sodio fosfato contenente lo 0.1% di sodio azide). Gli anticorpi primari utilizzati sono stati i seguenti:

- *Mouse anti-Parvalbumin (PV) monoclonale*, diluizione 1:5000 (Swant, Switzerland).
- *Mouse anti-Calbindin D-28k (CB D-28k) monoclonale*, diluizione 1:5000 (Swant, Switzerland)

- *Mouse anti-Calretinin (CR) monoclonale*, diluizione 1:1000 (Swant, Switzerland)

In seguito sono stati eseguiti 3 lavaggi in PBS 0.01M da 10 minuti ciascuno. Poi le sezioni sono state incubate per 2 ore, a temperatura ambiente, con l'anticorpo secondario biotinilato Goat anti-Mouse (diluizione 1:200; codice BA-9200, VectorLaboratories, Burlingame, CA), Normal Goat Serum (Colorado Serum Co., Denver, CO #CS 1324) all'1% e Triton X-100 allo 0.3% in PBS 0.01 M, pH 7.4.

Le sezioni poi sono state nuovamente lavate (3 lavaggi di 10 minuti ciascuno) e quindi trasferite in una soluzione di avidina-biotina (ABC) per 45 minuti a temperatura ambiente. Dopo successivi tre lavaggi da 10 minuti la reazione dell'immunoperossidasi è stata sviluppata impiegando la 3.3'-diaminobenzidina (DAB kit, SK-4100, Vector, Laboratories, Burlingame, CA). Le sezioni, quindi, sono state disidratate in alcool (50°, 75°, 80°, 90°, 95° e 100°), chiarificate in xilolo e montate utilizzando Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). I vetrini sono stati poi stoccati a temperatura ambiente. La specificità della reazione dell'immunoperossidasi è stata dimostrata omettendo, durante l'esecuzione della reazione, gli anticorpi primari impiegati. In questi preparati, infatti, non si è rilevata alcuna immunoreattività.

#### 7.1.4 Analisi delle sezioni

Le sezioni colorate con la tionina e sottoposte all'immunoperossidasi sono state osservate al microscopio Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

##### *A) Formazione ippocampale di cane: organizzazione anatomica e distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio*

Mediante l'analisi di tutte le sezioni colorate con la **tionina** è stato possibile definire l'organizzazione anatomica della formazione ippocampale di cane identificando, nel giro dentato, nell'ippocampo propriamente detto e nel subicolo, i differenti strati presenti. Mediante l'osservazione dei preparati sottoposti all'**immunoperossidasi** è stata valutata l'espressione di alcune proteine leganti il calcio (parvalbumina, calbindina D-28k e calretinina).

Per ogni proteina legante il calcio, in particolare, sono state prese in considerazione i seguenti aspetti:

- ✓ Morfologia dei neuroni. In base alla forma del soma i neuroni sono stati classificati in poligonali (P), fusiformi (F) e sferoidali (S). Inoltre, in ciascun distretto, è stata calcolata la distribuzione percentuale dei differenti tipi morfologici sopra elencati.
- ✓ Area del loro pirenoforo espressa come media ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  deviazione standard (DS) L'analisi morfometrica è stata eseguita impiegando il software AxiovisionRel 4.8.2. Le aree dei pirenofori immunoreattivi, espresse come media  $\pm$  deviazione standard (DS), sono state misurate dopo averne tracciato manualmente il profilo.
- ✓ Orientamento dendritico (parallelo o radiale).
  - ✓ Caratteristiche generali dell'immunostaining del neuropilo nei diversi strati che compongono il giro dentato, l'ippocampo

propriamente detto ed subicolo; in particolare è stata valutata l'immunoreattività del neuropilo diffuso (valutazione semiquantitativa in assente, debole, media e forte) e la densità dei processi dendritici immunoreattivi (valutazione semiquantitativa in assente, bassa, media ed elevata).

***B) Comparazione tra le caratteristiche anatomiche e neurochimiche della formazione ippocampale di soggetti giovani e anziani***

Per questa analisi sono state osservati i preparati colorati con la tionina e quelli sottoposti alla colorazione con l'immunoperossidasi.

Le sezioni colorate con la **tionina** sono state utilizzate per misurare lo spessore delle strutture costituenti la formazione ippocampale. A tal fine, per ogni soggetto, sono state analizzate 6 sezioni, dirette in senso rostro-caudale e poste ad una distanza reciproca di 240  $\mu\text{m}$ , rappresentative della parte centrale della formazione ippocampale. In particolare, su ogni sezione, è stato misurato lo spessore totale (asse dorso-ventrale) delle singole strutture (giro dentato, ippocampo propriamente detto, subicolo) che costituiscono la formazione ippocampale. In ogni struttura è stato misurato lo spessore ogni singolo strato:

- ✓ Giro dentato: strato molecolare, strato dei granuli e strato polimorfo
- ✓ Ippocampo propriamente detto: strato oriens, strato piramidale, strato radiato + strato lacunoso-molecolare
- ✓ Subicolo: strato I, strato II, strato III

I valori ottenuti nei due gruppi sono stati comparati utilizzando il t-test e i dati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

Nelle sezioni sottoposte alla reazione dell'**immunoperossidasi** è stato valutato, in ciascun strato del giro dentato, dell'ippocampo propriamente detto e del subicolo, il numero totale di neuroni

immunoreattivi per ciascuna proteina legante il calcio, comparando i dati dei soggetti giovani con quelli dei soggetti vecchi. In ciascun soggetto, per ogni proteina legante il calcio, sono state analizzate 6 sezioni corrispondenti a quelle colorate con la tionina e tra loro adiacenti.

Il numero dei neuroni nei diversi strati che compongono il giro dentato, l'ippocampo propriamente detto ed il subicolo nel gruppo 1 (cani giovani) e nel gruppo 2 (cani vecchi) è stato comparato utilizzando il t-test o il Mann-Whitney U test; i dati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

Tutte le immagini sono state acquisite in formato digitale usando la fotocamera digitale Polaroid DMC (Polaroid Corporation, Cambridge, MA) ed il software DMC2. Le immagini così ottenute sono state in seguito processate impiegando software Adobe Photoshop (Adobe System 10, San Jose, CA).

## 7.2 Risonanza magnetica della formazione ippocampale

Come accennato precedentemente, la formazione ippocampale riveste un ruolo di grande importanza nel controllo delle funzioni cognitive (Eichenbaum, 2001) ed è una delle regioni più vulnerabili ai processi di invecchiamento (Mesulam, 1999; Miller e O'Callahan, 2005).

In letteratura sono riportate alterazione a carico dell'encefalo di cani anziani ed esenti da patologie cerebrali, alcune delle quali visibili alla risonanza magnetica. Tra queste ricordiamo l'aumento di volume dei ventricoli laterali, l'atrofia della corteccia cerebrale, la presenza di aree ipointense (a livello di *globus pallidus* e *substantia nigra*) e aree iperintense (a livello di sostanza bianca periventricolare) nelle sequenze T2W (Min-Ying Su et al., 2004; Kimotsuki et al., 2005; Pugliese et al., 2010).

Lo scopo di questo studio è analizzare la formazione ippocampale di cane ed osservare se, analogamente ad altre strutture encefaliche, anche essa è soggetta ad alterazioni età-dipendenti. A tal proposito sono stati analizzati studi di risonanza magnetica effettuati su animali esenti da patologie intracraniche evidenti effettuati presso Dick White Referrals (Cambridge, UK) tra maggio 2007 e settembre 2014. Sono stati selezionati studi di risonanza magnetica di 134 soggetti: 84 animali giovani (1-3 anni; gruppo 1) e 50 animali anziani (>10 anni; gruppo 2).

Tutti gli studi sono stati ottenuti utilizzando una risonanza magnetica con campo 0.4 Tesla (Hitachi Aperto®). Per ogni soggetto sono state acquisite immagini sagittali e trasversali dello spessore di 4 mm generate con le sequenze T1W, T2W e FLAIR (fluid attenuated inversion recovery). A ogni animale è stata poi somministrata un'iniezione endovenosa di mezzo di contrasto (Dotarem®, gadoterate meglumine, 0.5 mmol/mL,

Guerbet) al dosaggio 0.1 mmol/kg, a cui è seguita un'ulteriore acquisizione di immagini con la sequenza T1W.

Sono stati selezionati gli studi di risonanza magnetica appartenenti ai soggetti che rispettavano i seguenti criteri di inclusione:

- animali esenti da patologie intracraniche evidenti
- animali d'età compresa tra 1 e 3 anni
- animali d'età superiore ai 10 anni

Per ogni animale sono stati registrati razza, età, peso corporeo, sesso, stato riproduttivo; successivamente sono stati divisi in due gruppi: cani giovani (gruppo 1; 1-3 anni) e anziani (gruppo 2; > 10 anni).

Per ogni soggetto è stata analizzata la formazione ippocampale nell'immagine trasversale ottenuta in FLAIR in cui erano presenti sia i collicoli rostrali che l'acquedotto mesencefalico (Figura 1 e 2). È stato scelto di utilizzare la sequenza FLAIR poiché si ha la soppressione del segnale del liquido cerebrospinale e quindi il profilo ippocampale appare meglio definito.

Per ogni immagine selezionata è stata misurata:

- altezza (diametro dorso-ventrale) dell'encefalo (mm)
- altezza (diametro dorso-ventrale) dell'formazione ippocampale destra (mm)
- altezza (diametro dorso-ventrale) dell'formazione ippocampale sinistra (mm)

Tutte le misurazioni sono state effettuate dal medesimo osservatore e allo stesso ingrandimento (400%).

Una volta ottenuti questi valori per ogni animale è stato calcolato il rapporto altezza dell'ippocampo (destra e sinistra)/altezza dell'encefalo X100. I dati ottenuti nei due gruppi sono stati comparati utilizzando il t-test e riportati come media ( $\pm$  deviazione standard, DS).

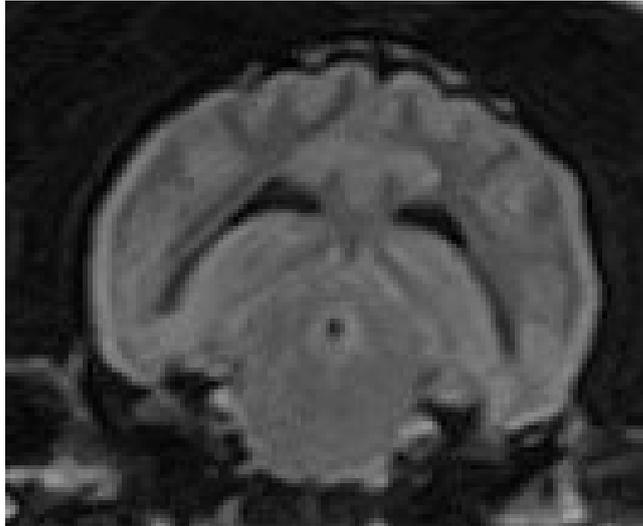


Figura 2. Sequenza FLAIR in cane maschio intero di 3 anni

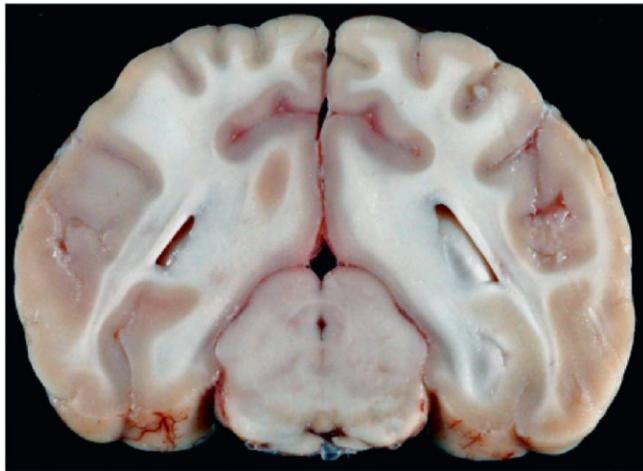


Figura 3: Sezione trasversale di encefalo di cane a livello di collicoli rostrali e acuedotto del mesencefalo (Thomson e Hahn, 2012)

## **8. RISULTATI**

### 8.1 Formazione ippocampale di cane: organizzazione anatomica e distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio

#### **8.1.1 Organizzazione anatomica**

Mediante la colorazione con la tionina è stato osservato che la formazione ippocampale di cane risulta, come nelle altre specie, costituita dal giro dentato, dall'ippocampo propriamente detto e dal subicolo (Figura 1A). E' opportuno sottolineare come non tutte queste strutture erano riscontrabili ad ogni livello setto-temporale. Infatti, in corrispondenza delle porzioni poste più rostro-dorsalmente era possibile evidenziare il giro dentato e l'ippocampo propriamente detto ma non il subicolo, il quale si osservava solo procedendo in direzione caudo-ventrale lungo l'asse setto-temporale.

Il giro dentato costituiva la porzione più mediale della formazione ippocampale (Figura 1A, 2A). Anche nel cane era possibile riconoscere, procedendo dall'esterno verso l'interno, i seguenti tre strati: strato molecolare, strato dei granuli e strato polimorfo (Figura 2A). A causa della notevole curvatura, il giro dentato si poneva attorno alla parte terminale dello strato piramidale dell'ippocampo propriamente detto (campo CA3) (Figura 2A).

L'ippocampo propriamente detto rappresentava la porzione più estesa di tutta la formazione ippocampale (Figura 1A). Analogamente a quanto osservato in altre specie, nell'ippocampo propriamente detto era possibile osservare, procedendo dall'esterno verso l'interno, la presenza dei seguenti strati: strato oriens, strato piramidale, strato radiato e strato lacunos-

molecolare (Figure 2A-C). In base alla dimensione ed alla densità dei neuroni piramidali era possibile anche nel cane distinguere i campi CA3, CA2 e CA1 (Figure 1A). Nel campo CA1 i neuroni piramidali si presentavano di dimensioni minori e più densamente stipati rispetto a quelli presenti nei campi CA2 e CA3 (Figura 2C).

Il subicolo si presentava come una struttura compresa tra l'ippocampo propriamente detto, dorsalmente, e la regione paraippocampale, ventralmente (Figura 1A). Nelle sezioni più rostrali il subicolo poteva essere apprezzato solo dorsalmente e ventralmente. Procedendo in direzione caudale era possibile evidenziarne progressivamente anche la porzione intermedia. Anche nel cane il subicolo era costituito da tre strati: strato molecolare (più interno; in continuità con lo strato lacunoso-molecolare e radiato del campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto), strato piramidale e strato polimorfo (più esterno; in continuità con lo strato oriens del campo CA1) (Figure 2D).

Nel complesso l'organizzazione anatomica dell'ippocampo di cane appariva molto simile a quella presente nei Roditori.

### **8.1.2 Caratteristiche generali dell'immunostaining**

L'immunoreattività per le proteine leganti il calcio poteva essere evidenziata, con differente grado di intensità, a seconda della proteina considerata e del compartimento cellulare interessato, nel pirenoforo e nei dendriti da questo emergenti, nei processi dendritici isolati (ovvero che non mostrano continuità diretta col corpo cellulare), nel neuropilo diffuso ed, occasionalmente, nei processi assonici. In base alla forma del pirenoforo i neuroni sono stati classificati in poligonali, fusiformi e sferoidali.

### 8.1.3 Distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio nella formazione ippocampale

#### A) Giro dentato

##### Parvalbumina

Il maggior numero di neuroni PV-IR, prevalentemente di forma poligonale, è stato osservato all'interno dello strato polimorfo; nello strato dei granuli e nello strato molecolare erano presenti un numero inferiore di cellule PV-positive, che presentavano principalmente un corpo cellulare poligonale. I neuroni presenti negli strati polimorfo e dei granuli mostravano dimensioni maggiori rispetto alle cellule immerse nello strato molecolare (Figura 3 A-C).

Il neuropilo diffuso appariva intensamente marcato nello strato dei granuli: era infatti presente un evidente plesso perigranulare che circondava le cellule principali del giro dentato che risultavano immunonegative. Anche la zona sopragranulare e lo strato polimorfo presentavano un'immunoreattività del neuropilo importante anche se inferiore rispetto a quella precedentemente descritta. L'immunoreattività del neuropilo diffuso all'interno dello strato molecolare, invece, era piuttosto bassa (Tabella 1) (Figure 1 B, 3 A,B).

**Tabella 1.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso PV-IR nel giro dentato.

Strato molecolare	+
Strato dei granuli	+++
Strato polimorfo	++

+++; IR forte; ++; IR media; +IR: debole; -: IR assente

I processi dendritici PV-IR erano evidenti negli strati molecolare e polimorfo. I dendriti dello strato molecolare erano grossi e paralleli fra

loro, diretti verso la superficie piaie; quelli dello strato polimorfo si mostravano, invece, più sottili e con orientamento radiale (Tabella 2) (Figura 3 A-C).

**Tabella 2.** Densità dei processi dendritici PV-IR nel giro dentato.

Strato molecolare	++
Strato dei granuli	+/-
Strato polimorfo	++

+++ : densità elevata; ++: densità media; +: densità bassa; -: processi dendritici assenti

### Calbindina-D28k

Il numero più elevato di neuroni CB-IR si osservava nello strato dei granuli dove virtualmente tutti i granuli si mostravano immunoreattivi. All'interno di questo strato sono stati osservati immunopositivi anche neuroni poligonali. Negli strati polimorfo e molecolare erano presenti neuroni CB-IR, principalmente di forma poligonale, rispettivamente di grandi e piccole dimensioni (Figura 7 A-F).

Il neuropilo diffuso CB-IR presentava una marcatura molto evidente negli strati molecolare e polimorfo, soprattutto nella parte più prossima allo strato dei granuli (Tabella 3) (Figure 1 C, 7 A,B). In quest'ultimo strato è stata osservata un'immunoreattività di tipo puntiforme. Le fibre muschiate erano fortemente CB-IR ed era possibile seguirne il percorso verso il campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto (Figura 7 A).

**Tabella 3.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CB-IR nel giro dentato.

Strato molecolare	+++
Strato dei granuli	+/-
Strato polimorfo	+++

+++ : IR forte; ++: IR media; +: IR debole; -: IR assente

Sottili e numerosi dendriti CB-IR paralleli fra loro e diretti verso la superficie piaie erano presenti nello strato molecolare; essi, tuttavia, apparivano poco evidenti per la presenza di un neuropilo diffuso intensamente marcato. A livello di strato polimorfo i dendriti CB-IR erano difficilmente individuabili poiché immersi nel neuropilo diffuso fortemente immunoreattivo; in ogni caso era possibile apprezzarne l'orientamento di tipo radiale (Tabella 4) (Figura 7 C,D).

**Tabella 4.** Densità dei processi dendritici CB-IR nel giro dentato.

Strato molecolare	++
Strato dei granuli	+/-
Strato polimorfo	++/+

+++; densità elevata; ++; densità media; +; densità bassa; -: processi dendritici assenti

### Calretinina

Nel giro dentato sono stati osservati pochi neuroni CR-IR; il maggior numero di cellule CR-IR era presente nello strato polimorfo (neuroni di grandi e piccole dimensioni, principalmente poligonali). Nello strato molecolare sono stati osservati neuroni CR-IR di piccole dimensioni con soma poligonale o sferoidale. Qualche neurone poligonale si trovava anche all'interno dello strato dei granuli (Figura 11 A-F).

Il neuropilo diffuso CR-IR era poco immunoreattivo: le zone maggiormente marcate erano rappresentate dalla parte adiacente ai granuli dello strato polimorfo e dalla parte più interna dello strato molecolare (Tabella 5) (Figure 1 D, 11 A-F).

**Tabella 5.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CR-IR nel giro dentato.

Strato molecolare	+
Strato dei granuli	-
Strato polimorfo	+

+++ : IR forte; ++ : IR media; + : IR debole; - : IR assente

Dendriti esprimenti la CR erano presenti, seppur poco immunoreattivi, negli strati polimorfo e molecolare (Tabella 6).; in entrambe le aree tali processi presentavano un andamento misto, sia orizzontale che radiale (Figura 11 D,F).

**Tabella 6.** Densità dei processi dendritici CR-IR nel giro dentato.

Strato molecolare	+
Strato dei granuli	-
Strato polimorfo	++/+

+++ : densità elevata; ++ : densità media; + : densità bassa; - : processi dendritici assenti

## B) Ippocampo propriamente detto

### Parvalbumina

Il maggior numero di neuroni immunoreattivi per la PV è stato osservato a livello di strato oriens, soprattutto nel campo CA1; i corpi cellulari erano prevalentemente poligonali e fusiformi. Cellule PV-IR, soprattutto poligonali ed occasionalmente piramidali, erano presenti anche nello strato piramidale, specialmente del campo CA1. In questa zona la maggioranza dei neuroni (di forma piramidale) era localizzata al confine con gli strati oriens e radiato; tuttavia, qualche cellula è stata osservata anche all'interno nello strato piramidale. Alcuni neuroni PV-IR si trovavano al confine tra gli strati radiato e lacunoso-molecolare (Figure 4 A-D, 5 A-D).

Il neuropilo diffuso PV-IR era presente soprattutto nello strato piramidale dove formava un plesso intorno ai neuroni piramidali non

immunoreattivi. Una buona immunoreattività è stata osservata nello strato oriens, mentre negli strati radiato e lacunoso-molecolare era scarsa (Tabella 7) (Figure 1 B, 4 A, 5 A)

**Tabella 7.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso PV-IR nell'ippocampo propriamente detto (campi CA3 e CA1).

Strato oriens	++
Strato piramidale	+++
Strato radiato	+
Strato lacunoso-molecolare	+/-

+++; IR forte; ++: IR media; +: IR debole; -: IR assente

Dendriti PV-IR erano presenti soprattutto negli strati oriens e radiato (Tabella 8): nel primo erano sottili e mostravano un andamento radiale; nel secondo, invece, erano spessi e paralleli fra loro. Nel campo CA3 i dendriti attraversavano anche lo strato lacunoso-molecolare, mentre nel campo CA1 non oltrepassavano lo strato radiato (Figure 4 B-D, 5 B-D).

**Tabella 8.** Densità dei processi dendritici PV-IR nell'ippocampo propriamente detto (campi CA3 e CA1).

Strato oriens	+++
Strato piramidale	+/-
Strato radiato	+++
Strato lacunoso-molecolare	+/-

+++; densità elevata; ++: densità media; +: densità bassa; -: processi dendritici assenti

### Calbindina-D28k

Nel campo CA3 il maggior numero di neuroni CB-IR è stato osservato nello strato oriens e, in minor misura, nello strato piramidale (Figura 8 A-C). Nel campo CA1 la situazione appariva invertita; infatti, le cellule immunoreattive per la CB erano più numerose nello strato piramidale che nello strato oriens (Figura 9 A-D). Nello strato oriens di entrambe le aree, le cellule CB-IR mostravano una morfologia principalmente poligonale e, in minor misura, fusiforme. Nello strato

piramidale di entrambi i campi ippocampali erano marcate le cellule principali, i neuroni piramidali; tra di essi si trovavano immersi anche grandi cellule CB-IR di forma poligonale. A livello di strato radiato e lacunoso-molecolare dei campi CA3 e CA1 sono stati osservati pochi neuroni CB-IR, principalmente di aspetto poligonale (Figure 8 A-C, 9 A-D).

A livello di strato lucido di campo CA3 le fibre muschiate presentavano una marcatura piuttosto evidente: esse decorrevano sia a livello infra- che soprapiramidale, per terminare al confine con il campo CA2 (Figura 8 A-C). Una buona immunoreattività del neuropilo diffuso è stata osservata negli strati oriens e molecolare; al contrario negli strati piramidale e radiato tale marcatura era inferiore (Tabella 9) (Figure 1 C, 8 A-C). Nel campo CA1 neuropilo diffuso CB-IR è stato osservato soprattutto a livello di strato oriens e, in misura minore, nello strato piramidale (Figure 1 C, 9 A-D). Negli strati radiato e lacunoso-molecolare la marcatura era, seppur presente, inferiore (Tabella 10) (Figure 8 A-C, 9 A-D).

**Tabella 9.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CB-IR nell'ippocampo propriamente detto (campo CA3).

Strato oriens	++
Strato piramidale	+/-
Strato lucido	+++
Strato radiato	+
Strato lacunoso-molecolare	++

+++ : IR forte; ++ : IR media; + : IR debole; - : IR assente

**Tabella 10.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CB-IR nell'ippocampo propriamente detto (campo CA1).

Strato oriens	++
Strato piramidale	+
Strato radiato	+/-
Strato lacunoso-molecolare	+/-

+++; IR forte; ++: IR media; +: IR debole; -: IR assente

I dendriti CB-IR nel campo CA3 erano numerosi nello strato oriens, dove si mostravano sottili e con andamento radiale; negli altri strati tali processi erano piuttosto scarsi ed orientati radialmente (Tabella 11) (Figura 8 B,C). Nel campo CA1 il numero maggiore di neuroni CB-IR è stato osservato negli strati oriens e piramidale (Tabella 12): nel primo erano sottili e con andamento radiale, mentre nel secondo erano più ispessiti, paralleli fra loro e diretti verso la fessura ippocampale. Tali dendriti si estendevano anche nello strato radiato e occasionalmente potevano esser seguiti fino a quello lacunoso-molecolare (Figura 9 B-D). Quest'ultimo strato presentava anche scarsi dendriti orientati radialmente.

**Tabella 11.** Densità dei processi dendritici CB-IR nell'ippocampo propriamente detto (campo CA3).

Strato oriens	+++
Strato piramidale	+
Strato radiato	+
Strato lacunoso-molecolare	+/-

+++; densità elevata; ++: densità media; +: densità bassa; -: processi dendritici assenti

**Tabella 12.** Densità dei processi dendritici CB-IR nell'ippocampo propriamente detto (campo CA1).

Strato oriens	+++
Strato piramidale	+++
Strato radiato	+
Strato lacunoso-molecolare	+/-

+++; densità elevata; ++: densità media; +: densità bassa; -: processi dendritici assenti

## Calretinina

I neuroni CR-IR erano scarsamente rappresentati nell'ippocampo propriamente detto. Tali cellule erano localizzate soprattutto nello strato oriens del campo CA1 e negli strati radiato e lacunoso-molecolare del campo CA3 (Figure 12 A-C, 13 A,B). Le cellule CR-IR presentavano un soma di piccole dimensioni con morfologia principalmente poligonale o sferoidale.

Il neuropilo diffuso, per quanto poco immunoreattivo, si trovava a livello di strati oriens e lacunoso-molecolare dei campi CA1 e CA3 (Tabella 13) (Figure 1 D, 12 A, 13 A).

**Tabella 13.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CR-IR nell'ippocampo propriamente detto (campi CA3 e CA1).

Strato oriens	++
Strato piramidale	+/-
Strato radiato	+/-
Strato lacunoso-molecolare	++

+++ : IR forte; ++ : IR media; + : IR debole; - : IR assente

Dendriti CR-IR poco marcati erano presenti quasi esclusivamente nello strato oriens dei campi CA1 e CA3 (Tabella 14) (Figure 12 B,C, 13 A,B).

**Tabella 14.** Densità dei processi dendritici CR-IR nell'ippocampo propriamente detto (campi CA3 e CA1).

Strato oriens	++
Strato piramidale	+/-
Strato radiato	+/-
Strato lacunoso-molecolare	+/-

+++ : densità elevata; ++ : densità media; + : densità bassa; - : processi dendritici assenti

## C) Subicolo

### Parvalbumina

I neuroni PV-IR erano rari in tutti gli strati del subicolo; tra questi lo strato che mostrava il maggior numero di neuroni marcati era rappresentato dal III. I corpi cellulari avevano prevalentemente una morfologia poligonale, ma qualche neurone fusiforme è stato osservato nello strato III. In generale tutte le cellule PV-IR presentavano dimensioni ridotte (Figura 6 A,B).

Il neuropilo PV-IR era maggiormente marcato nello strato II, seguito dallo strato III, mentre a livello di strato I appariva scarsamente immunoreattivo (Tabella 15) (Figure 1 B, 6 A).

**Tabella 15.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso PV-IR nel subicolo.

Strato I	+
Strato II	+++
Strato III	++

+++; IR forte; ++: IR media; +: IR debole; -: IR assente

Nello strato I sono stati osservati grossi processi dendritici PV-IR che decorrevano paralleli fra loro; negli strati II e III erano presenti un numero inferiore di dendriti più sottili ed orientati radialmente (Tabella 16) (Figura 6 A,B).

**Tabella 16.** Densità dei processi dendritici PV-IR nel subicolo.

Strato I	+++
Strato II	++
Strato III	++

+++; densità elevata; ++: densità media; +: densità bassa; -: processi dendritici assenti

## Calbindina-D28k

Il numero maggiore di neuroni CB-IR era rappresentato dai grandi neuroni piramidali dello strato II; fra questi era presente anche qualche cellula poligonale immunoreattiva per la CB. Un buon numero di piccoli neuroni poligonali e sferoidali è stato osservato anche nello strato III (in numero maggiore rispetto ai neuroni CB-IR nello strato oriens di CA1), mentre nello strato I sono stati evidenziati pochi neuroni di aspetto poligonale (Figura 10 A,B).

Il neuropilo diffuso CB-IR era molto evidente in tutti e tre gli strati che compongono il subicolo (Tabella 17); nello strato III, in particolare, presentava una marcatura maggiore rispetto all'adiacente strato oriens del campo CA1 (Figure 1 C, 10 A).

**Tabella 17.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CB-IR nel subicolo.

Strato I	+++
Strato II	+++
Strato III	+++

+++ : IR forte; ++ : IR media; + : IR debole; - : IR assente

Nello strato II sono stati osservati grossi dendriti che decorrevano paralleli fra loro ed appartenenti ai neuroni piramidali; negli strati I e III i processi dendritici marcati erano più sottili e mostravano un orientamento sia parallelo che radiale (Tabella 18) (Figura 10 A, B).

**Tabella 18.** Densità dei processi dendritici CB-IR nel subicolo.

Strato I	+
Strato II	+++
Strato III	+

+++ : densità elevata; ++ : densità media; + : densità bassa; - : processi dendritici assenti

## Calretinina

Il maggior numero di neuroni CR-IR è stato evidenziato nello strato I: tali cellule erano poligonali o sferoidali e di piccole dimensioni. Negli altri strati i neuroni immunoreattivi per la CR erano in numero ridotto (Figura 13 C,D).

Il neuropilo diffuso CR-IR era presente soprattutto a livello di strato II e in misura minore nello strato I (Tabella 19) (Figure 1 D, 13 C).

**Tabella 19.** Immunoreattività (IR) del neuropilo diffuso CR-IR nel subicolo.

Strato I	++
Strato II	+++
Strato III	+

+++; IR forte; ++: IR media; +: IR debole; -: IR assente

I dendriti CR-IR erano poco rappresentati in tutti gli strati subicolari (Tabella 20) (Figura 13 C,D).

**Tabella 20.** Densità dei processi dendritici CR-IR nel subicolo.

Strato I	+
Strato II	+
Strato III	+

+++; densità elevata; ++: densità media; +: densità bassa; -: processi dendritici assenti

L'area media del pirenoforo dei neuroni PV-, CB-D28k- e CR-IR nei diversi strati del giro dentato, dell'ippocampo propriamente detto e del subicolo è indicata in tabella 21.

**Tabella 21.** Area media (espressa in  $\mu\text{m}^2 \pm$  deviazione standard) dei pirenofori immunoreattivi per le proteine leganti il calcio (parvalbumina, PV; calbindina D-28k, CB-28k; calretinina, CR) presenti nella formazione ippocampale.

Giro dentato	PV	CB-D28k	CR
Strato molecolare	180.19 $\pm$ 77.59	134.48 $\pm$ 45.35	144.92 $\pm$ 66.03
Strato dei granuli	297.34 $\pm$ 196.75	238.57 $\pm$ 36.91	141.92 $\pm$ 65.81

Strato polimorfo	243.79 ± 98.12	249.79 ± 102.23	175.52 ± 74.94
<b>Ippocampo pd</b>	<b>PV</b>	<b>CB-D28k</b>	<b>CR</b>
Strato oriens	241.61 ± 90.38	228.23 ± 76.23	110.78 ± 56.75
Strato piramidale	295.88 ± 119.50	328.33 ± 108.01	284.72 ± 122.97
Strato radiato+lac-mol	359.87 ± 165.81	250.44 ± 75.59	187.90 ± 81.75
<b>Subicolo</b>	<b>PV</b>	<b>CB-D28k</b>	<b>CR</b>
Strato I	181.93 ± 43.01	287 ± 52.85	86.67 ± 22.36
Strato II	148.38 ± 38.51	348.95 ± 84.03	97.22 ± 17.06
Strato III	110.82 ± 22.19	108.44 ± 31.06	93.29 ± 38.08

La distribuzione percentuale delle differenti tipologie morfologiche di neuroni PV-, CB-D28k- e CR-IR presenti nei vari strati del giro dentato, dell'ippocampo propriamente detto e del subicolo è indicata in tabella 22. I neuroni sono stati classificati in poligonali (P), fusiformi (F), sferoidali (S) e piramidali (PIR). I valori sono espressi in percentuale.

**Tabella 22.** Distribuzione percentuale delle differenti tipologie morfologiche (P: poligonali; F: fusiformi; S: sferoidali; PIR: piramidali) di neuroni immunoreattivi per le proteine leganti il calcio (parvalbumina, PV; calbindina D-28k, CB-28k; calretinina, CR) presenti nella formazione ippocampale.

<b>Giro dentato</b>	<b>PV</b>	<b>CB-D28k</b>	<b>CR</b>
Strato molecolare	57 P, 29 F, 14 S	59 P, 18 F, 23 S	63 P, 16 F, 21 S
Strato dei granuli	77 P, 23 PIR	100 P*	100 P
Strato polimorfo	83 P, 7 F, 11 S	86 P, 14 S	80 P, 7 F, 13 S
<b>Ippocampo pd</b>	<b>PV</b>	<b>CB-D28k</b>	<b>CR</b>
Strato oriens	75 P, 20 F, 5 S	70 P, 16 F, 14 S	60 P, 20 F, 20 S
Strato piramidale	90 P, 10 PIR	52 PIR, 48 P	80 PIR, 20 P
Strato radiato+lac-mol	100 P	93 P, 7 F	58 P, 8 F, 33 S
<b>Subicolo</b>	<b>PV</b>	<b>CB-D28k</b>	<b>CR</b>
Strato I	100 P	100 P	77 P, 23 S
Strato II	100 P	76 PIR, 24 P	60 P, 40 S
Strato III	83 P, 17 F	52 P, 48 S	67 P, 33 S

\*(non sono comprese le cellule dei granuli)

## 8.2. Comparazione tra le caratteristiche anatomiche e neurochimiche della formazione ippocampale di cani giovani e vecchi

Come detto precedentemente questa analisi è stata fatta valutando, nelle sezioni colorate con tionina, lo spessore totale del giro dentato, dell'ippocampo propriamente detto e del subicolo, nonché lo spessore dei singoli strati di ciascuna struttura. Nelle sezioni sottoposte alla reazione dell'immunoperossidasi, è stato valutato, per ciascuna struttura ed in ciascun strato, il numero totale di neuroni immunoreattivi per ciascuna proteina legante il calcio, comparando i dati ottenuti nei soggetti giovani con quelli dei soggetti vecchi.

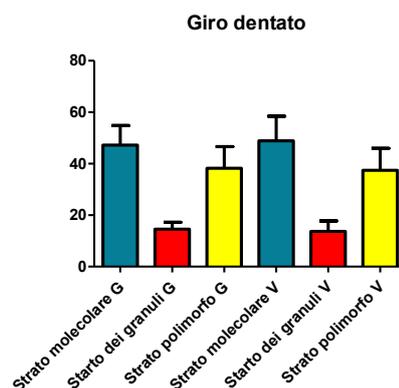
### **8.2.1 Analisi morfometriche sui preparati colorati con la tionina**

Le analisi morfometriche condotte sulle differenti strutture della formazione ippocampale non hanno messo in evidenza differenze significative tra i soggetti giovani e vecchi per quanto riguarda sia il dato assoluto (spessore in  $\mu\text{m}$  di ogni struttura o di ogni singolo strato) che relativo (percentuale di spessore occupata da ciascun strato nell'ambito di ciascuna struttura ippocampale) E' tuttavia importante sottolineare come il dato assoluto non debba essere considerato determinante, vista la disomogeneità tra i due gruppi confrontati, in termini sia di razza che di mole.

## A) Giro dentato

Lo spessore (espresso come media  $\pm$  DS) degli strati molecolare, dei granuli e polimorfo era rispettivamente di  $413.72 \mu\text{m} \pm 86.51$ ,  $128.26 \mu\text{m} \pm 30.77$ ,  $344.79 \mu\text{m} \pm 122.50$  nel gruppo 1 (cani giovani) e di  $540.69 \mu\text{m} \pm 191.98$ ,  $147.00 \mu\text{m} \pm 46.82$ ,  $432.46 \mu\text{m} \pm 205.66$  nel gruppo 2 (cani vecchi). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nello spessore dei singoli strati che costituiscono il giro dentato.

Gli strati molecolare, dei granuli e polimorfo rappresentavo, in percentuale, il  $47.25\% \pm 7.59$ ,  $14.53\% \pm 2.66$  e  $38.22\% \pm 8.43$  del giro dentato nel gruppo 1 (cani giovani) ed il  $48.91\% \pm 9.40$ ,  $13.67\% \pm 4.07$  e  $37.42\% \pm 8.55$  del giro dentato nel gruppo 2 (cani vecchi) (Grafico 1). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nella rappresentazione percentuale di ogni singolo strato all'interno del giro dentato dei cani giovani e vecchi.



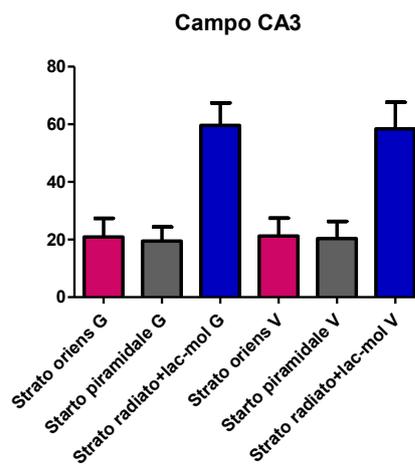
**Grafico 1.** Rappresentazione percentuale dei diversi strati che compongono il giro dentato di cani giovani (G) e vecchi (V).

## B) Ippocampo propriamente detto

### *Campo CA3*

Lo spessore (espresso come media  $\pm$  DS) degli strati oriens, piramidale e radiato+lacunososo-molecolare era rispettivamente di  $286.34 \mu\text{m} \pm 122.06 \mu\text{m}$ ,  $256.49 \mu\text{m} \pm 43.69$  e  $808.38 \mu\text{m} \pm 186.88$  nel gruppo 1 (cani giovani) e di  $274.51 \mu\text{m} \pm 115.61$ ,  $255.38 \mu\text{m} \pm 59.7$ ,  $767.7 \mu\text{m} \pm 231.26$  nel gruppo 2 (cani vecchi). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nello spessore dei singoli strati che costituiscono il campo CA3.

Gli strati oriens, piramidale e radiato+lacunososo-molecolare rappresentavano, in percentuale, il  $20.91\% \pm 6.46$ ,  $19.47\% \pm 4.91$  e  $59.62\% \pm 7.82$  del campo CA3 (cani giovani) ed il  $21.25\% \pm 6.19$ ,  $20.34\% \pm 5.96$  e  $58.41\% \pm 9.21$  del campo CA3 nel gruppo 2 (cani vecchi) (Grafico 2). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nella rappresentazione percentuale di ogni singolo strato all'interno del campo CA3 dei cani giovani e vecchi.

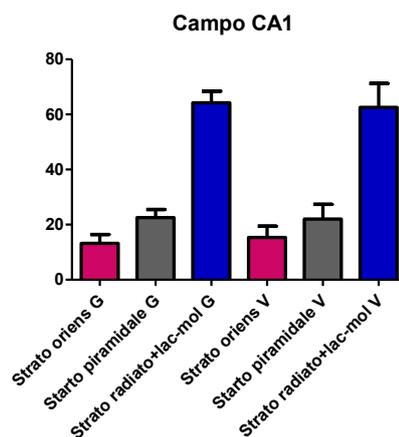


**Grafico 2.** Spessore dei diversi strati che compongono il campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

### *Campo CA1*

Lo spessore (espresso come media  $\pm$  DS) degli strati oriens, piramidale e radiato+lacunososo-molecolare era rispettivamente di  $203.95 \mu\text{m} \pm 48.74$ ,  $354.04 \mu\text{m} \pm 91.43$ ,  $1006.58 \mu\text{m} \pm 231.50$  nel gruppo 1 (cani giovani) e di  $239.27 \mu\text{m} \pm 43.44$ ,  $343.56 \mu\text{m} \pm 44.76$ ,  $1003.82 \mu\text{m} \pm 173.77$  nel gruppo 2 (cani vecchi). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nello spessore dei singoli strati che costituiscono il campo CA1.

Gli strati oriens, piramidale e radiato+lacunososo-molecolare rappresentavano, in percentuale, il  $13.22\% \pm 3.24$ ,  $22.56\% \pm 2.97$  e  $64.22\% \pm 4.19$  del campo CA1 nel gruppo 1 (cani giovani) ed il  $15.35\% \pm 4.07$ ,  $22.06\% \pm 5.32$  e  $62.59\% \pm 8.65$  del campo CA1 nel gruppo 2 (cani vecchi) (Grafico 3). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nella rappresentazione percentuale di ogni singolo strato all'interno del campo CA1 dei cani giovani e vecchi.

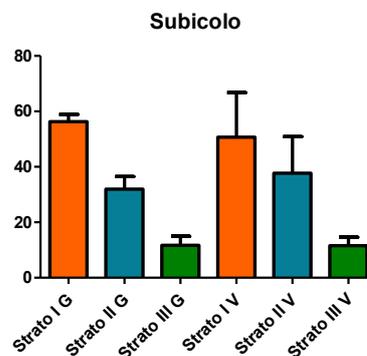


**Grafico 3.** Spessore dei diversi strati che compongono il campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

### C) Subicolo

Lo spessore (espresso come media  $\pm$  DS) degli strati I, II e III era rispettivamente di  $1167.10 \mu\text{m} \pm 41.3$ ,  $666.17 \mu\text{m} \pm 120.42$ ,  $2075.97 \mu\text{m} \pm 111.91$  nel gruppo 1 (cani giovani) e di  $1033.12 \mu\text{m} \pm 357.03$ ,  $711.8 \mu\text{m} \pm 130.76$ ,  $220.12 \mu\text{m} \pm 317.78$  nel gruppo 2 (cani vecchi). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nello spessore dei singoli strati che costituiscono il subicolo.

Gli strati I, II e III rappresentavano, in percentuale, il  $56.31\% \pm 2.56$ ,  $31.96\% \pm 4.54$  e  $11.73\% \pm 3.22$  del subicolo nel gruppo 1 (cani giovani) ed il  $50.69\% \pm 16.05$ ,  $37.73\% \pm 13.18$  e  $11.58\% \pm 3.04$  del subicolo nel gruppo 2 (cani vecchi) (Grafico 4). Comparando i due gruppi di animali, non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa nella rappresentazione percentuale di ogni singolo strato all'interno del subicolo dei cani giovani e vecchi.

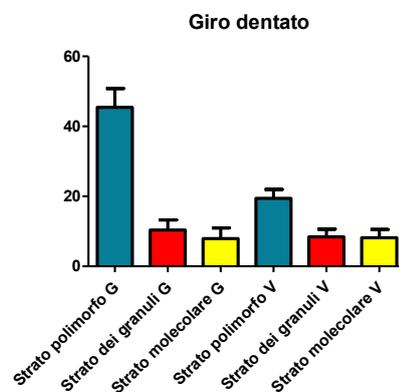


**Grafico 4.** Spessore dei diversi strati che compongono il subicolo di cani giovani (G) e vecchi (V).

## 8.2.2. Quantificazione dei neuroni esprimenti proteine leganti il calcio nei cani giovani e vecchi

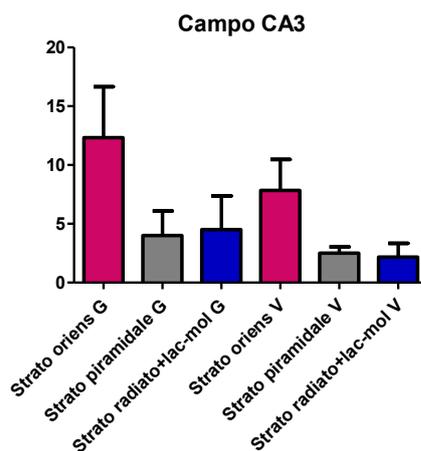
### A) Parvalbumina

Il numero di neuroni PV-IR nello strato polimorfo e nello strato dei granuli del giro dentato è risultato significativamente maggiore nei cani giovani (Grafico 5) (Figura 15 A,B).



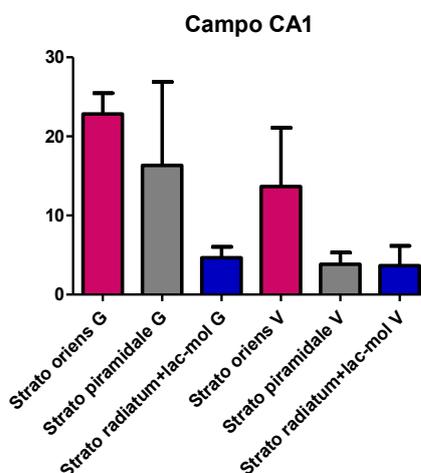
**Grafico 5.** Numero di neuroni PV-IR presenti nel giro dentato di cani giovani (G) e vecchi (V).

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra i due gruppi nel numero di neuroni PV-IR nel campo CA3 (Grafico 6).



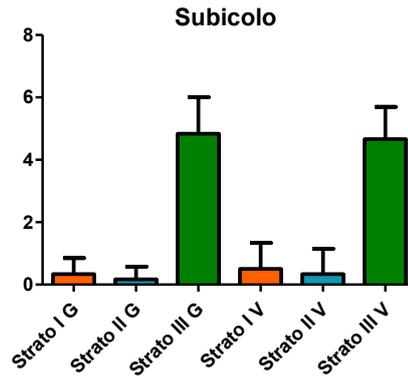
**Grafico 6.** Numero di neuroni PV-IR presenti nel campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

Il numero di neuroni PV-IR nello strato oriens e nello strato piramidale del campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto è risultato significativamente maggiore nei cani giovani (Grafico 7) (Figura 15 C,D).



**Grafico 7.** Numero di neuroni PV-IR presenti nel campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

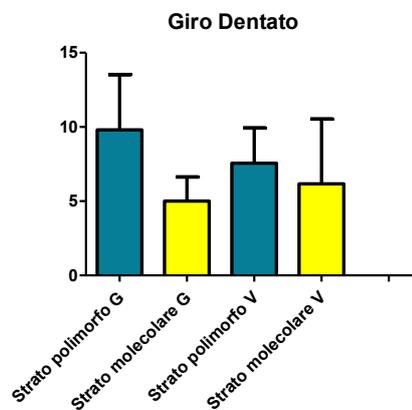
Nel subicolo non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nel numero di neuroni PV-IR tra i due gruppi (Grafico 8).



**Grafico 8.** Numero di neuroni PV-IR presenti nel subicolo di cani giovani (G) e vecchi (V).

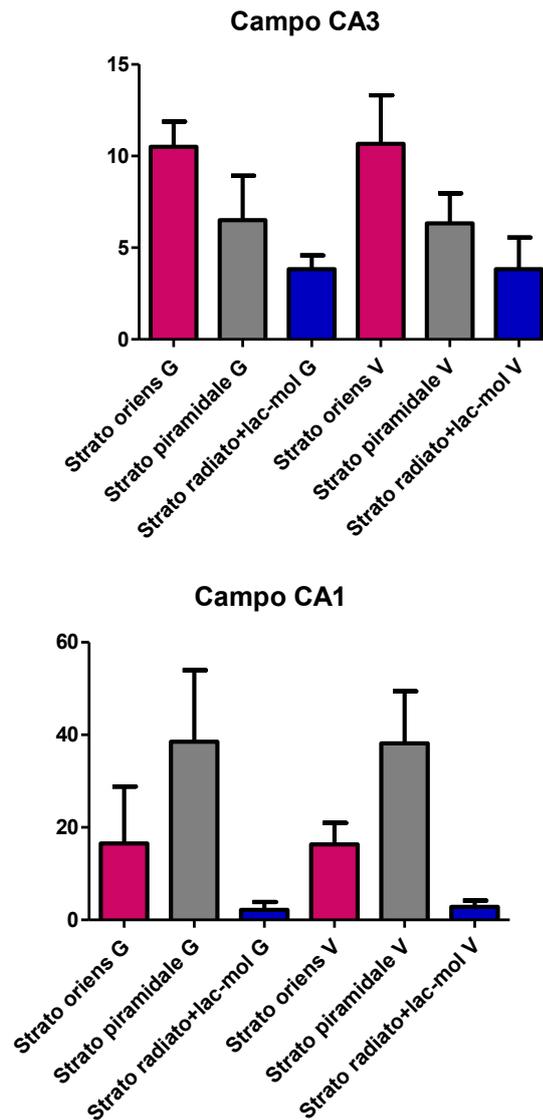
## B) Calbindina-D28k

Nel giro dentato non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nel numero di neuroni CB-IR tra i due gruppi (Grafico 9) (Figura 14 A,B).



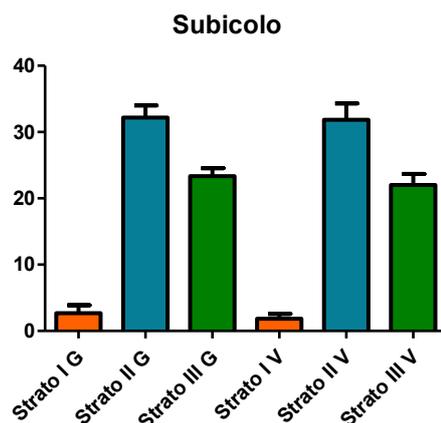
**Grafico 9.** Numero di neuroni CB-IR presenti nel giro dentato di cani giovani (G) e vecchi (V).

Nei campi CA1 e CA3 dell'ippocampo propriamente detto non è stata osservata nessuna differenza significativa nel numero dei neuroni CB-IR nei due gruppi (Grafico 10) (Figura 14 C).



**Grafico 10.** Numero di neuroni CB-IR presenti nei campi CA3 e CA1 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

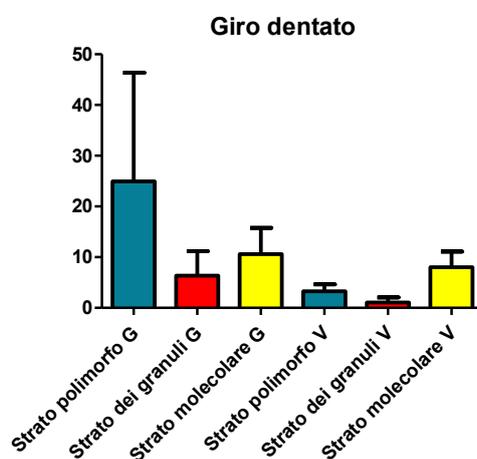
Nel subicolo non è stata osservata nessuna differenza significativa nel numero dei neuroni CB-IR tra i due gruppi (Grafico 11).



**Grafico 11.** Numero di neuroni CB-IR presenti nel subicolo di cani giovani (G) e vecchi (V).

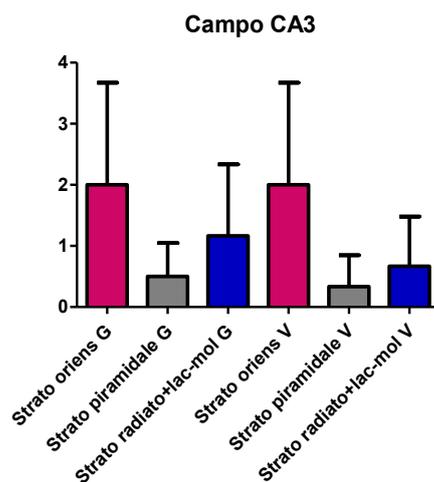
### C) Calretinina

Il numero di neuroni CR-IR nello strato polimorfo e nello strato dei granuli del giro dentato è risultato significativamente maggiore nei cani giovani (Grafico 12) (Figura 16 A,B).



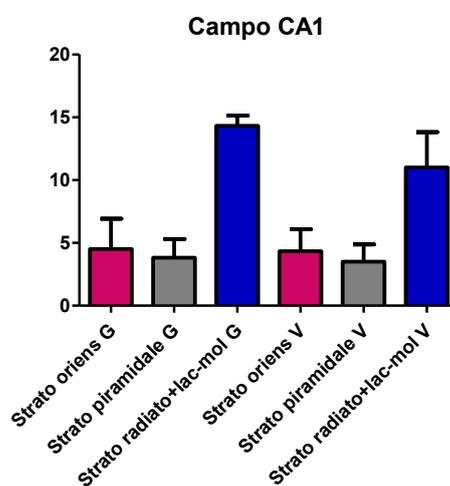
**Grafico 12.** Numero di neuroni CR-IR presenti nel giro dentato di cani giovani (G) e vecchi (V).

Nel campo CA3 non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nel numero di neuroni PV-IR tra i due gruppi (Grafico 13).



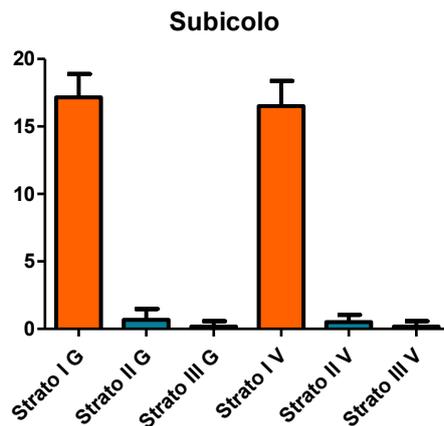
**Grafico 13.** Numero di neuroni CR-IR presenti nel campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

Nello strato radiato e lacunoso-molecolare del campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto è stato osservato un numero significativamente maggiore di neuroni CR-IR nei cani giovani (Grafico 14) (Figura 16 C,D).



**Grafico 14.** Numero di neuroni CR-IR presenti nel campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto di cani giovani (G) e vecchi (V).

A livello subicolare non è stata osservata nessuna differenza significativa nel numero dei neuroni CR-IR tra i due gruppi (Grafico 15).

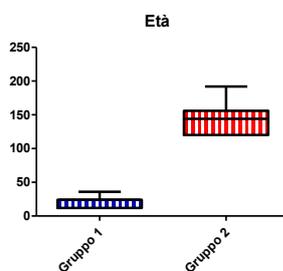


**Grafico 15.** Numero di neuroni CR-IR presenti nel subicolo di cani giovani (G) e vecchi (V).

### 8.3 Comparazione della formazione ippocampale di cani giovani e vecchi alla risonanza magnetica

Le razze più rappresentate nel gruppo 1 erano: Labrador Retriever (16), Jack Russel Terrier (10), English Springer Spaniel (5) e Labradoodle (4); nel gruppo 2 le razze più numerose erano: Labrador Retriever (6), Border terrier (6), Golden Retriever (5) e Border Collie (6) (Tabella 23).

Nel gruppo 1 l'età media era 24 mesi (range 12-36), mentre nel gruppo 2, 144 mesi (120-192). Ovviamente la differenza tra i due gruppi era statisticamente significativa (Mann-Whitney U test;  $p < 0.01$ ) (Grafico 16).



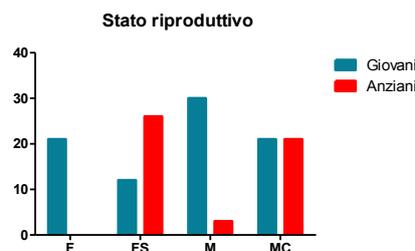
**Grafico 16.** Età media dei cani giovani (Gruppo 1) e vecchi (Gruppo 2).

**Tabella 23.** Razze dei cani giovani (Gruppo 1) e vecchi (Gruppo 2).

	Gruppo1	Gruppo 2
Alaskan Malamute	1	/
Australian Terrier	/	1
Australian Cattle Dog	1	/
Basset Hound	1	1
Beagle	3	/
Bearded Collie	1	/
Bernese Mountain Dog	1	/
<b>Border Collie</b>	2	<b>5</b>
<b>Border Terrier</b>	2	<b>6</b>
Chihuahua	/	1
Boxer	/	1
British Bulldog	1	/
Chinese Crested Mountain	1	/
Cavalier King Charles Spaniel	1	1
Cockapoo	1	/
Cocker spaniel	2	1
Corgi	/	1
Collie	1	1
Dalmatian	/	1
Dogue de Bordeaux	1	/
English Bull terrier	1	/
English Pointer	1	/
<b>English Springer Spaniel</b>	<b>5</b>	2
<b>Golden Retriever</b>	2	<b>5</b>
Greyhound	/	1
German Sheperd	3	1
Irish Setter	/	1
<b>Jack Russel Terrier</b>	<b>10</b>	4
<b>Labradoodle</b>	<b>4</b>	/
<b>Labrador Retriever</b>	<b>16</b>	<b>6</b>
Lakeland Terrier	1	/
Lhasa Apso	1	/
Manchester Terrier	1	/
Miniature Schnautzer	1	/
Norfolk Terrier	1	/
Poodle	3	/
Pug	1	/
Rottweiler	1	/
Schnauzer	1	/
Shih Tzu	/	2
Siberian Husky	1	/
Spinon	1	/
Staffordshire Bull Terrier	1	2
Tibetan Terrier	1	/
Toy Poodle	1	/
Vizla	2	/
Weimaraner	/	1
West Highland White Terrier	3	1
Whippet	/	2
Yorkshire Terrier	2	2
<b>Tot</b>	<b>84</b>	<b>50</b>

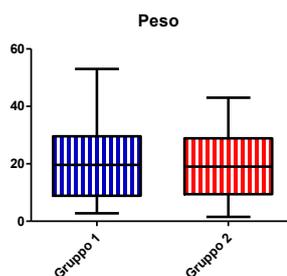
Nel gruppo 1 erano presenti 21 femmine intere (F), 12 femmine sterilizzate (FS), 30 maschi interi (M) e 21 maschi castrati (MC). Il gruppo 2 era composto da 26 femmine sterilizzate (FS), 3 maschi interi (M) e 21 maschi castrati (MC); non erano presenti femmine intere nel gruppo 2 (F).

Utilizzando il Chi-square test è stato comparato il sesso nei due gruppi (Grafico 17): le femmine intere e i maschi interi erano statisticamente più rappresentati nel gruppo 1 (rispettivamente  $p < 0.01$  e  $p = 0.01$ ), mentre le femmine sterilizzate erano quelle più numerose nel gruppo 2 ( $p < 0.01$ ). I maschi castrati non mostravano nessuna differenza statisticamente significativa tra due gruppi ( $p = 0.41$ ).



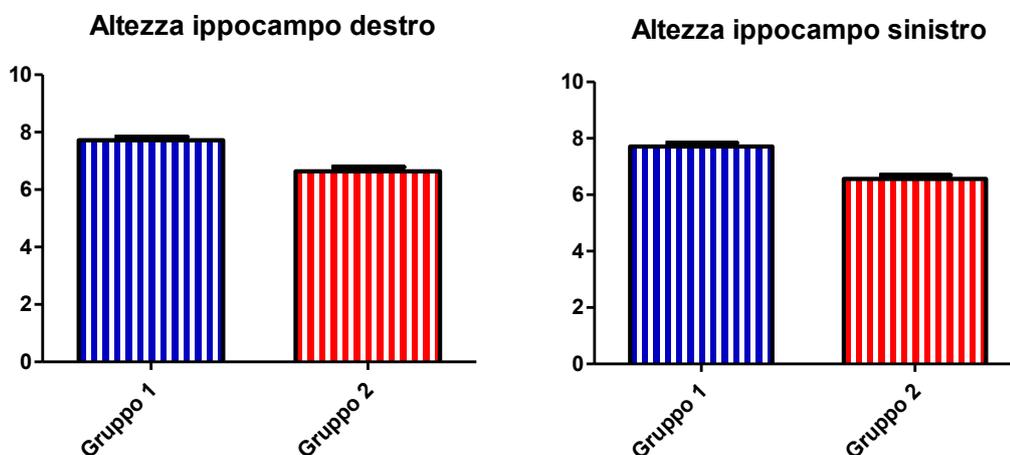
**Grafico 17.** Stato riproduttivo nei cani giovani e vecchi.

Il peso corporeo medio dei cani appartenenti al gruppo 1 era di 19.6 kg (range 2.8-53), mentre nel gruppo 2 era di 19 kg (range 1.5-43). Utilizzando il Mann-Witney U test è stato comparato il peso corporeo tra i due gruppi che non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa ( $p = 0.98$ ) (Grafico 18).



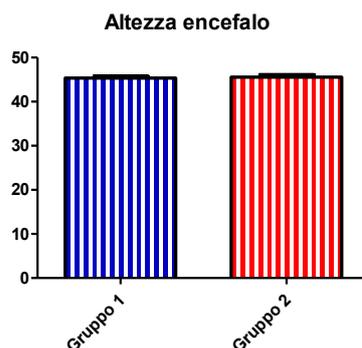
**Grafico 18.** Peso medio dei cani giovani (Gruppo 1) e vecchi (Gruppo 2).

L'altezza media (intesa come diametro dorsoventrale) della formazione ippocampale destra era 7.7 (1.1) mm nel gruppo 1 e 6.6 (1.1) mm nel gruppo 2.; la formazione ippocampale sinistra misurava rispettivamente 7.7 (1.2) mm e 6.6 (0.9) mm. Utilizzando il t-test student la differenza di altezza tra la formazione ippocampale dei cani giovani e quello dei cani vecchi è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) (Grafico 19).



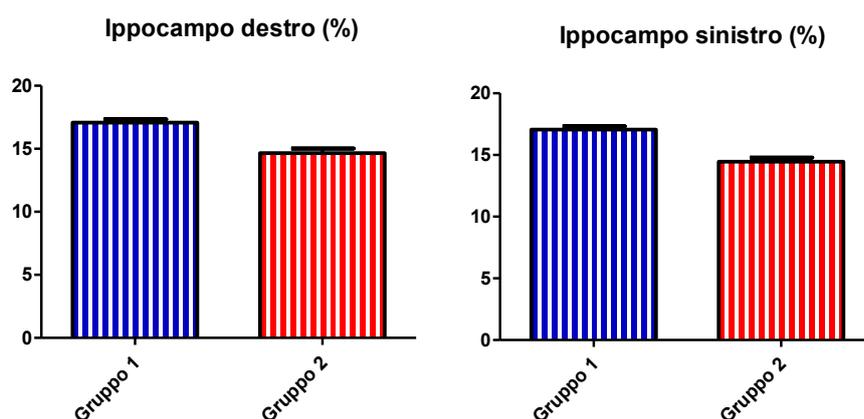
**Grafico 19.** Altezza media della formazione ippocampale nei cani giovani (Gruppo 1) e vecchi (Gruppo 2).

L'altezza media dell'encefalo (intesa come diametro dorsoventrale) era 45.3 (3.4) mm nel gruppo 1 e 45.5 (4) mm nel gruppo 2; il t-test student non ha evidenziato alcuna differenza significativa ( $p = 0.075$ ) (Grafico 20).



**Grafico 20.** Altezza media dell'encefalo nei cani giovani (Gruppo 1) e vecchi (Gruppo 2).

Per ogni soggetto è stato calcolato il rapporto altezza formazione ippocampale (destra e sinistra)/altezza encefalo x100. Nel gruppo 1 la formazione ippocampale destra era il 17.1 (2.4) % dell'altezza dell'encefalo, mentre nel gruppo 2 rappresentava il 14.7 (2.5)%. La formazione ippocampale sinistra era 17.1 (2.6) % nel gruppo 1 e 14.5 (2.3) % nel gruppo 2. I valori percentuali così ottenuti sono stati comparati tra i due gruppi utilizzando il t-test che ha mostrato una differenza significativa ( $p < 0.01$ ) sia per la formazione ippocampale destra che per la sinistra (Grafico 21).



**Grafico 21.** Percentuale occupata dalla formazione ippocampale sull'altezza dell'encefalo nei cani giovani (Gruppo 1) e vecchi (Gruppo 2).

## 9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### 9.1 Formazione ippocampale di cane: organizzazione anatomica e distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio

Mediante la colorazione con la tionina è stato osservato che la formazione ippocampale di cane risulta, come nelle altre specie, costituita dal giro dentato, dall'ippocampo propriamente detto e dal subicolo. Nel complesso questa struttura si presenta molto simile a quella dei Roditori.

La distribuzione delle proteine leganti il calcio è stata studiata in dettaglio nella formazione ippocampale di ratto nel quale l'immunoreattività per parvalbumina, calbindina e calretinina si presenta simile a quella osservata nella scimmia (Celio, 1990; Gulyás et al., 1992; Miettinen et al., 1992; Résibois e Rogers, 1992; Freund e Maglóczy, 1993; Maglóczy et al., 1994; Nitsch e Ohm, 1995). I risultati del presente studio dimostrano come l'organizzazione anatomica e la distribuzione dell'immunoreattività per le proteine leganti il calcio nella formazione ippocampale di cane siano simili a quanto si osserva nei Primati e nei Roditori. La formazione ippocampale, tuttavia, mostra, nei differenti animali studiati, alcune caratteristiche correlate alla specie o all'ordine di appartenenza, come di seguito riportato.

I neuroni poligonali **parvalbumina (PV)-IR** di grandi dimensioni presenti nell'ippocampo propriamente detto nei Primati mostrano una morfologia molto più complessa rispetto a quanto si osserva nel cane e nei Roditori (Sloviter, 1989; Celio, 1990; Ribak et al., 1990; Braak et al., 1991; Seress et al., 1991, 1993a; Pitkänen e Amaral, 1993). Nei Roditori questi neuroni sembrano rappresentare una classe di cellule basket (Ribak et al., 1990). Dal momento che nel cane, nella scimmia e nell'Uomo tali neuroni hanno una morfologia ed una distribuzione simile a quanto osservato nel

ratto, è possibile ipotizzare come anche in queste specie tali cellule costituiscano una sottopopolazione di interneuroni inibitori in grado di innervare mediante basket pericellulari i neuroni piramidali.

La distribuzione dell'immunoreattività per la **calbindina-D28k (CB)** è molto simile nella formazione ippocampale di cane, Roditori e Primati. Tuttavia, un'eccezione è rappresentata dai neuroni piramidali del campo CA1 che nel cane, nei Roditori e nell'Uomo non sono intensamente immunoreattivi come invece avviene nella scimmia (Sloviter, 1989; Celio, 1990; Seress et al., 1991, 1993a). È importante notare come in tutte le specie sopra indicate la maggior parte dei neuroni piramidali CB-IR risieda soprattutto nel campo CA1. Il campo CA3, al contrario, mostra un numero ridotto di cellule piramidali CB-IR. Analogamente a quanto osservato, non solo in Primati e Roditori, ma anche in altri Mammiferi (Cetacei, Marsupiali, Megachiroteri, Insettivori e Monotremi) (Ferrer et al., 1992; Glezer et al., 1995), le fibre muschiate mostrano una forte immunoreattività per la CB anche nella formazione ippocampale di cane.

La distribuzione dell'immunoreattività per la **calretinina (CR)**, al contrario della CB, mostra un'importante variabilità interspecifica. La parte più interna dello strato molecolare del giro dentato è caratterizzata da un neuropilo che, nei Primati è intensamente immunoreattivo, mentre nel ratto è poco marcato (Jacobowitz e Winsky, 1991; Gulyás et al., 1992; Miettinen et al., 1992; Résibois e Rogers, 1992; Nitsch e Ohm, 1995). Dal presente studio sembra che nel cane il plesso sopragranulare CR-IR abbia un'intensità di colorazione intermedia tra Primati e Roditori. Inoltre, nel cane, nei Primati e nei Roditori è presente un abbondante plesso CR-IR nello strato lacunoso-molecolare dell'ippocampo propriamente detto. In questo strato il numero di neuroni immunoreattivi per la CR sembra essere maggiore nei Primati e nei Roditori che nel cane (Nitsch e Leranth, 1993; Seress et al., 1993b; Maglóczy et al., 1994; Nitsch e Ohm, 1995).

L'immunoreattività per la CR a livello di strato molecolare del giro dentato sembra coincidere con la zona di terminazione delle proiezioni estrinseche alla formazione ippocampale (Gulyás et al., 1992; Nitsch e Leranth, 1993; Seress et al., 1993b; Maglóczy et al., 1994). Perciò le differenze osservate nell'intensità di marcatura del neuropilo CR-IR nel ratto, nel cane, nella scimmia e nell'Uomo sembrano riflettere una differenza interspecifica riguardante l'entità di afferenze che raggiungono la formazione ippocampale.

E' altamente probabile che popolazioni neuronali con caratteristiche neurochimiche e morfologiche simili svolgano le medesime funzioni all'interno della formazione ippocampale in Roditori, Carnivori e Primati. Tuttavia la presenza di alcune peculiarità specie-specifiche sembra suggerire come alcune caratteristiche nella distribuzione delle proteine leganti il calcio abbiano seguito un percorso evolutivo diverso nei differenti Mammiferi (Celio, 1990; Résibois e Rogers, 1992; Ferrer et al., 1992; Glezer et al., 1995).

## 9.2 Comparazione tra le caratteristiche anatomiche e neurochimiche della formazione ippocampale di cani giovani e vecchi

Le analisi relative allo spessore totale e dei singoli strati costituenti la formazione ippocampale non mostrano, sia in termini assoluti che percentuali (percentuale di spessore occupata da ciascun strato nell'ambito di ciascuna struttura ippocampale), variazioni significative tra i due gruppi di età differente. E' importante sottolineare, tuttavia, come non essendo i gruppi utilizzati rappresentati da soggetti della stessa razza e della stessa mole, il dato assoluto relativo allo spessore delle strutture e dei loro strati

assume un valore poco significativo. L'analisi morfometrica, tuttavia, consente di indicare con una certa affidabilità come i rapporti relativi (ovvero la percentuale di spessore occupata da ciascun strato) tra i differenti strati nell'ambito di ciascuna struttura ippocampale (giro dentato, ippocampo propriamente detto e subicolo) non subiscano variazioni età dipendenti.

La compromessa omeostasi intracellulare di calcio che si verifica durante il processo di invecchiamento è uno dei fattori principali che contribuisce, sia nell'Uomo che negli animali, al deterioramento della memoria e delle capacità di apprendimento (Khachaturian 1987, 1994; Lanfield, 1987). Studi condotti su modelli animali hanno evidenziato che la mancata omeostasi intracellulare di calcio può portare a eccitotossicità e morte neuronale (Choi 1992, 1994). Nei neuroni della formazione ippocampale, l'aumento età-dipendente dei potenziali di membrana calcio-dipendenti può essere arginato da sistemi che bloccano il flusso di calcio all'interno dei neuroni attraverso i canali del calcio di tipo L (Moyer et al., 1992; Moyer e Disterhoft, 1994; Thibault et al., 1998). Tra i meccanismi che portano a una perdita di regolazione della concentrazione di calcio intracellulare durante il processo di invecchiamento si ricordano le alterazioni a livello di canali ionici voltaggio-dipendenti (Campbell et al., 1996; Thibault e Landfield, 1996; Thibault et al., 2001; Veng et al., 2003; Foster, 2007), i cambiamenti mitocondriali (Leslie et al., 1985; Nicholls, 1985; Babcock et al., 1997; Kruman e Mattson, 1999; LaFrance et al., 2005) e le alterazioni delle proteine leganti il calcio (Amenta et al., 1994; Bu et al., 2003). PV, CB-D28k e CR appartengono alla famiglia omologa delle EF-hand, un gruppo di proteine leganti il calcio che gioca un ruolo importante nella regolazione della concentrazione del calcio intracellulare in vari tessuti, compreso quello nervoso (Celio, 1990; Baimbridge et al., 1992; Gulyàs et al., 1996; DeFelipe, 1997). È importante ricordare che la

riduzione delle proteine leganti il calcio è stata associata a diverse malattie neurodegenerative e ad alterate capacità mnemoniche. Ad esempio, in soggetti affetti da malattia d'Alzheimer è stata dimostrata una riduzione di queste proteine (Mikkonen et al., 1997, 1999). Inoltre, in topi transgenici CB-deficitari è stata osservato un peggioramento delle capacità correlate all'apprendimento spaziale ed una incapacità di mantenere il potenziamento a lungo termine che, com'è noto, rappresenta un evento sinaptico indispensabile per la formazione della memoria (Molinari et al., 1996; Brown et al., 2004, 2008).

La formazione ippocampale riveste un ruolo di grande importanza nel controllo delle funzioni cognitive (Eichenbaum, 2001) e rappresenta una delle regioni più vulnerabili ai processi di invecchiamento (Mesulam, 1999; Miller e O'Callahan, 2005). Nonostante siano stati condotti diversi studi sull'espressione età-dipendente delle proteine leganti il calcio nel sistema nervoso in varie specie (Armbrecht et al., 1999; Choi et al., 2008; Molinari et al., 1996; Potier et al., 1994; Pugliese et al., 2004; Sisó et al., 2003; Villa et al., 1994; Yang et al., 2008), vi sono pochi studi condotti utilizzando come modello il cane. Per tale motivo parte del presente studio ha analizzato il numero dei neuroni immunoreattivi per PV, CB-D28k e CR in cani giovani e vecchi, al fine di evidenziarne eventuali differenze.

### Parvalbumina

Nei Roditori e nei Primati i neuroni immunoreattivi per la PV sono soggetti ad alterazioni morfologiche, di densità e di dimensioni età-dipendenti (Seto-Ohshima et al. 1988; Seki e Arai 1995; de Jong et al. 1996). Tuttavia, in alcuni distretti encefalici, quali cervelletto e nucleo reticolare del talamo, non sono stati osservati cambiamenti significativi correlati all'età nei neuroni PV-IR (Sato et al. 1991; Lolova e Davidoff 1992). A livello di formazione ippocampale e di bulbo olfattivo di ratto,

invece, è stata dimostrata una riduzione età dipendente dei neuroni PV-IR (Seki e Arai 1995; Hwang et al. 2003). Studi condotti nel cane a livello di giro dentato e di campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto non hanno evidenziato una diminuzione del numero di cellule PV-IR nei soggetti vecchi (Hwang et al., 2008). Nel presente studio, invece, è stata osservata una riduzione nel numero di cellule PV-IR a livello di strati polimorfo e dei granuli nel giro dentato e negli strati oriens e piramidale del campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto. Una possibile spiegazione di questa discrepanza potrebbe risiedere nel fatto che nello studio condotto da Hwang et al. (2008) i soggetti definiti anziani avevano 10 anni, mentre nel presente studio l'età oscillava tra 14 e 15 anni. Si può pertanto ipotizzare che sia presente una riduzione numerica dei neuroni PV-IR solo in soggetti di età particolarmente avanzata.

### Calbindina-D28k

L'espressione della CB è soggetta a cambiamenti correlati all'età in diversi distretti encefalici quali cervelletto, nucleo pretettale, collicolo caudale, bulbo olfattivo e formazione ippocampale (Iacopino et al. 1990; Kurobe et al. 1992; Potier et al., 1994; Villa et al. 1994; Molinari et al., 1996; Zettel et al. 1997; Kishimoto et al. 1998; Armbrrecht et al., 1999; Hwang et al., 2002; Sisó et al., 2003; Pugliese et al., 2004; Yang et al., 2008). Nella formazione ippocampale di ratto e di cane è stata dimostrata una riduzione dell'espressione della CB età-correlata (Kurobe et al. 1992; Choi et al., 2010). Tuttavia, nel presente studio non è stata osservata nessuna differenza significativa nel numero di neuroni CB-IR in nessuna regione della formazione ippocampale (giro dentato, ippocampo propriamente detto e subicolo). E' importante sottolineare che nel cane la riduzione dell'espressione della CB è stata testata in studi precedenti solo nel giro dentato, in particolare a livello di cellule dei granuli (Choi et al.,

2010). Nel presente studio la valutazione numerica dei neuroni CB-IR nel giro dentato ha preso in considerazione solo gli interneuroni ma non i granuli (cellule principali). Questi ultimi apparivano tutti virtualmente immunoreattivi, sia nei soggetti giovani che in quelli vecchi. Tuttavia, non avendo nel presente studio condotto una conta analitica dei granuli non è possibile escludere quanto riportato da Choi et al. (2010).

### Calretinina

In Roditori e Lagomorfi l'espressione della CR non sembra variare con l'invecchiamento. Infatti, non è stata osservata una diminuzione numerica delle cellule CR-IR a livello di bulbo olfattivo, di corteccia peririnale e di formazione ippocampale (de Jong et al., 1996; Kishimoto et al., 1998; Mirich et al. 2002; Hwang et al. 2006; Choi et al., 2010; Moyer et al., 2011). Al contrario, nell'Uomo, è presente una riduzione numerica delle cellule CR-IR a livello di corteccia cerebrale (Bu et al., 2003). Nel presente studio è stata osservata una diminuzione dei neuroni CR-IR a livello di strati polimorfo e dei granuli, nel giro dentato, e a livello di strati radiato e lacunoso-molecolare, nel campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto. Poiché in letteratura i dati riguardanti l'espressione età-dipendente della CR nella formazione ippocampale di cane sono pressoché assenti, i risultati del presente studio costituiscono un punto di partenza per ulteriori indagini relative alle variazioni di espressione di questa proteina in soggetti di età differenti.

### **Formazione ippocampale e Risonanza magnetica**

La risonanza magnetica (RM) offre la possibilità di indagare patologie correlate all'età come la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson e la demenza, poiché durante questi eventi morbosi si osservano alterazioni macroscopiche a carico dell'encefalo, in particolare a livello di

formazione ippocampale, di complesso amigdaloideo e di corteccia cerebrale (Drayer 1988b; Rusinek et al., 1991; Murphy et al., 1992; Cuenod et al., 1993; Killiany et al., 1993).

In Medicina Umana, studi di RM condotti su pazienti anziani e clinicamente sani dimostrano come sia presente un certo grado di atrofia cerebrale (dilatazione del sistema ventricolare, solchi cerebrali più profondi, aree ipointense a livello di sostanza nera e globo pallido e aree iperintense nella sostanza bianca) (Drayer 1988a; Coffey et al., 1992; Murphy et al., 1992; Golomb et al., 1993). Accanto ad alterazioni riscontrabili alla RM, nelle persone anziane sono state evidenziate anche alterazioni istopatologiche quali riduzione del numero dei neuroni, placche senili, deposito di lipofuscina ed attivazione astrocitaria (West, 1979; Coleman e Flood, 1987; Hansen et al., 1987; Dickson, 1997).

Nonostante nei cani di età avanzata siano state documentate alterazioni età-correlate simili a quelle riscontrate nell'Uomo (Head, 2013), in letteratura sono presenti pochi studi condotti utilizzando la RM (Su et al., 1998; Hasegawa et al., 2005; Kimotsuki et al., 2005; Pugliese et al., 2010).

Il presente studio ha evidenziato come in cani vecchi, clinicamente sani ed esenti da patologie intracraniche evidenti sia presente una riduzione significativa dell'asse dorsoventrale della formazione ippocampale sia di destra che di sinistra. Tale riduzione, come riportato precedentemente, non è stata osservata, sia in termini assoluti che relativi (percentuale di spessore occupata da ciascun strato), mediante l'analisi istologica. Una possibile spiegazione a tale discrepanza potrebbe risiedere nel fatto che i soggetti utilizzati per lo studio microscopico erano in numero decisamente inferiore rispetto a quelli osservati mediante RM. Di conseguenza, al fine della valutazione delle dimensioni della formazione ippocampale, si ritiene sicuramente più attendibile, nella presente ricerca, in dato ottenuto in RM.

# BIBLIOGRAFIA

- Acsády L, Arabadzisz D, Freund TF (1996a). Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of VIP-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73:299-315.
- Acsády L, Gores TJ, Freund TF (1996b). Different populations of VIP-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73:317-334.
- Acsády L, Halasy K, Freund TF (1993). Calretinin is present in nonpyramidal cells of the rat hippocampus-III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. *Neuroscience* 52:829-841.
- Aika Y, Ren JQ, Kosaka K, Kosaka T (1994). Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector. *Exp Brain Res* 99:267-276.
- Amaral DG (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851-914.
- Amaral DG (1999). Introduction: what is where in the medial temporal lobe? *Hippocampus* 9:1-6.
- Amaral DG, Dent JA (1981). Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51-86.
- Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* 1:415-436.
- Amaral DG, Insausti R, Cowan WM (1984). The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol* 224:307-336.
- Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res* 83:1-11.
- Amaral DG, Kurz J (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 240:37-59.
- Amaral DG, Lavenex P (2007). Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (eds) *The hippocampus book*. Oxford University Press, New York.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007). The dentate gyrus DG: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.
- Amaral DG, Witter MP (1989). The three dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Amaral DG, Witter MP (1995). Hippocampal formation. In: *The rat nervous system*, 2nd ed (Paxinos G, ed), pp 443-494. New York:Academic Press.
- Amenta F, Cavalotta D, Del Valle ME, Mancini M, Sabbatini M, Torres JM, Vega JA (1994). Calbindin D-28k immunoreactivity in the rat cerebellar cortex: age-related changes. *Neurosci Lett* 178:131-134.
- Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res* 13:222-238.
- Arantius G (1587). *De humano foetu ...Ejusdem anatomicorum observationum liber*. Venice.
- Armbrrecht HJ, Boltz MA, Kumar VB, Flood JD and Morley JE (1999). Effect of age on calcium-dependent proteins in hippocampus of senescence-accelerated mice. *Brain Res* 842: 287-293.

- Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca<sup>2+</sup> network. *J Cell Biol* 136:833–844.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15:303–308.
- Baimbridge KG, Miller JJ (1982). Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res* 245:223-229.
- Baimbridge KG, Miller JJ, Parkes CO (1982). Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res* 239:519-525.
- Baisden RH, Woodruff ML, Hoover DB (1984). Cholinergic and noncholinergic septo-hippocampal projections: a double-label horseradish peroxidase-acetylcholinesterase study in the rabbit. *Brain Res* 290:146–151.
- Bakst I, Avendano C, Morrison JH, Amaral DG (1986). An experimental analysis of the origins of somatostatin-like immunoreactivity in the dentate gyrus of the rat. *J Neurosci* 6:1452-1462.
- Bartesaghi R, Gessi T, Sperti L (1989). Electrophysiological analysis of the hippocampal projections to the entorhinal area. *Neuroscience* 30:51-62.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11:771-787.
- Beckstead RM (1978). Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res* 152:249-64.
- Blackstad TW (1956). Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol* 105:417–537.
- Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat: an experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 138:433–450.
- Blasco-Ibanez JM, Freund TF (1995). Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci* 7:2170-2180.
- Borhegyi Z, Leranth C (1997). Distinct substance P-and calretinin-containing projections from the supramammillary area to the hippocampus in rats: a species difference between rats and monkeys. *Exp Brain Res* 115:369–374.
- Boyett JM, Buckmaster PS (2001). Somatostatin-immunoreactive interneurons contribute to lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of control and epileptic rats. *Hippocampus* 11:418–422.
- Braak E, Strotkamp B and Braak H (1991) Parvalbumin-immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. *Cell Tissue Res* 264:33-48.
- Broca P (1878). Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique. *Rev. Anthropol* 1:385–498.
- Brodal A (1947). The hippocampus and the sense of smell: a review. *Brain* 70:179–222.
- Brown TH, Byrne JH, Lebar K, LeDoux J, Lindquist DH, Thompson RF, Teyler TJ (2004). Learning and memory: Basic mechanisms. In: Byrne, JH.; Roberts, JL., editors. *Cellular and molecular neuroscience*. Academic Press; San Diego p. 499-583.
- Brown TH, Zhao Y, Leung V (2008). Hebbian Synapses. In: Squire, LR., editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press; Oxford.
- Bu J, Sathyendra V, Nagykerly N, Geula C (2003). Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol* 182:220-31.

- Buckmaster PS, Kunkel DD, Robbins RJ, Schwartzkroin PA (1994). Somatostatin immunoreactivity in the hippocampus of mouse, rat, guinea pig and rabbit. *Hippocampus* 4:167-180.
- Buckmaster PS, Schwartzkroin PA (1995a). Interneurons and inhibition in the dentate gyrus of the rat in vivo. *J Neurosci* 15:774-789.
- Buckmaster PS, Schwartzkroin PA (1995b). Physiological and morphological heterogeneity of dentate gyrus-hilus interneurons in the gerbil hippocampus in vivo. *Eur J Neurosci* 7:1393-402.
- Buckmaster PS, Strowbridge BW, Kunkel DD, Schmiege DL, Schwartzkroin PA (1992). Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice. *Hippocampus* 2:349-362.
- Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1996). Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol* 366:271-292.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994a). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka W, Karnup SV, Somogyi P (1994b). Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71:1289-1307.
- Campbell LW, Hao SY, Thibault O, Blalock EM, Landfield PW (1996). Aging changes in voltage-gated calcium currents in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 16:6286-6295.
- Canteras N, Swanson L (1992). Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324:180-194.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1992a). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol* 324:143-79.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1992b). Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol* 324:195-212.
- Celio MR (1986). Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231:995-997.
- Celio MR (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.
- Chandler JP, Crutcher KA (1983). The septohippocampal projection in the rat: an electron microscopic horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 10:685-96.
- Chicurel ME, Harris KM (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325:169-82.
- Choi DW (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Choi DW (1994). Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci* 747:162-171.
- Choi JH, Hwang IK, Yoo KY, Yi SS, Park OK, Lee CH, Yoon YS, Won MH (2009). Reduction of calbindin D-28k-immunoreactive neurons in the dog dentate gyrus. *J Vet Med Sci* 71:1125-1128.

- Choi JH, Lee CH, Yoo KY, Hwang IK, Lee IS, Lee YL, Shin HC, Won MH (2010). Age-related Changes in Calbindin-D28k, Parvalbumin, and Calretinin Immunoreactivity in the Dog Main Olfactory Bulb. *Cell Mol Neurobiol* 30:1–12.
- Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL (1985). The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15: 1159-1181.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 246:435–458.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1990). A quantitative three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 302:206–219.
- Coffey CE, Wilkinson WE, Parashos IA, Soady SA, Sullivan RJ, Patterson LJ, Figiel GS, Webb MC, Spritzer CE, Djang WT (1992). Quantitative cerebral anatomy of the aging human brain: a cross-sectional study using magnetic resonance imaging. *Neurology* 42:527-36.
- Coleman PD, Flood DG (1987). Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 8:521-45.
- Conrad LCA, Leonard CM, Pfaff DW (1974). Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol* 156:179–206.
- Cuénod CA, Denys A, Michot JL, Jehenson P, Forette F, Kaplan D, Syrota A, Boller F (1993). Amygdala atrophy in Alzheimer's disease. An in vivo magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol* 50:941-5.
- Daitz HM, Powell TPS (1954). Studies of the connexions of the fornix system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 17:75–82.
- Danos P, Frotscher M, Freund TF (1991). Non-pyramidal cells in the CA3 region of the rat hippocampus: relationships of fine structure, synaptic input and chemical characteristics. *Brain Res* 546: 195-202.
- Davies S, Kohler C (1985). The substance P innervation of the rat hippocampal region. *Anat Embryol* 173:45-52.
- De Garengot RJC (1742). *Splanchnologie ou l'anatomie des visceres*, 2nd ed, pp 250–251. Paris: C. Osmond.
- De Lahunta and Glass (2009). *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology*. Saunders Elsevier.
- de Quidt ME, Emson PC (1986). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system-11. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 18:545-618.
- Deacon TW, Eichenbaum H, Rosenberg P, Eckmann KW (1983). Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 220:168-90.
- DeFelipe J (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28k, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14:1–19.
- Deller T, Adelmann G, Nitsch R, Frotscher M (1996). The alvear pathway of the rat hippocampus. *Cell Tissue Res* 286:293–303.
- Deller T, Leranth C (1990). Synaptic connections of neuropeptide-Y (NPY) immunoreactive neurons in the hilar area of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 300:433-447.

- Deller T, Nitsch R, Frotscher M (1995b). Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tracing of commissural fibers to the rat dentate gyrus: evidence for a previously unknown commissural projection to the outer molecular layer. *J Comp Neurol* 352:55-68.
- Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW (1985). Interhemispheric pathways of the hippocampal formation, presubiculum and entorhinal and posterior parahippocampal cortices in the rhesus monkey: the structure and organization of the hippocampal commissures. *J Comp Neurol* 233:30-47.
- Demeulemeester H, Arckens L, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW and Pochet R (1991). Calcium binding proteins and neuropeptides as molecular markers of GABAergic interneurons in the cat visual cortex. *Exp Brain Res* 84:538-544.
- Dent JA, Galvin NJ, Stanfield BB, Cowan WM (1983). The mode of termination of the hypothalamic projection to the dentate gyrus: an EM autoradiographic study. *Brain Res* 258:1-10.
- Desmond NL, Levy WB (1985). Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neurosci Lett* 54:219-224.
- Dickson DW (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:321-39.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4214-4218.
- Divila JC, Megias M, Andreu MJ, Real MA, Guiradi S (1995). NADPH diaphorase-positive neurons in the lizard hippocampus: a distinct subpopulation of GABAergic interneurons. *Hippocampus* 5:60-70.
- Dolleman-Van der Weel MJ, Witter MP (2000) Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neurosci Lett* 278:145-148.
- Donovan MK, Wyss JM (1983) Evidence for some collateralization between cortical and diencephalic efferent axons of the rat subicular cortex. *Brain Res* 259:181-192.
- Drayer BP (1988a). Imaging of the aging brain. Part I. Normal findings. *Radiology* 166:785-96.
- Drayer BP (1988b). Imaging of the aging brain. Part II. Pathologic conditions. *Radiology* 166:797-806.
- Dun NJ, Dun SL, Wong RK, Forstermann U (1994). Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2955-2959.
- Eccles JC (1964). *The physiology of synapses*. Berlin: Springer-Verlag.
- Eichenbaum H (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 127: 199-207.
- Esclapez M, Houser CR (1995). Somatostatin neurons are a subpopulation of GABA neurons in the rat dentate gyrus: evidence from colocalization of pre-prosomatostatin and glutamate decarboxylase messenger RNAs. *Neuroscience* 64:339-355.
- Ferrer I., Zujar, MJ Admella C and Alcántara S (1992). Parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the cerebral cortex of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Anat* 180:165-174.
- Finch DM, Babb TL (1981). Demonstration of caudally directed hippocampal efferents in the rat by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res* 214:405-10.

- Finch DM, Nowlin NL, Babb TL (1983). Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Res* 271:201-16.
- Finch DM, Wong EE, Derian EL, Babb TL (1986). Neurophysiology of limbic system pathways in the rat: projections from the subicular complex and hippocampus to the entorhinal cortex. *Brain Res* 397:205-13.
- Finsen BR, Tonder N, Augood S, Zimmer J (1992). Somatostatin and neuropeptide Y in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience* 47:105-113.
- Foster TC (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6:319–325.
- Freund TF and Maglóczy Zs (1993). Early degeneration of calretinin-containing neurons in the rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience* 56:581-596.
- Freund TF, Antal M (1988). GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336:170-173.
- Freund TF, Buzsáki G (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.
- Freund TF, Gulyás AI, Acsády L, Görcs T, Tóth K (1990c). Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8501-8505.
- Freund TF, Martin KA, Smith AD, Somogyi P (1983). Glutamate decarboxylase-immunoreactive terminals of Golgi-impregnated axo-axonic cells and of presumed basket cells in synaptic contact with pyramidal neurons of the cat's visual cortex. *J Comp Neurol* 221:263-278.
- Frotscher M (1992). Application of the Golgi/electron microscopy technique for cell identification in immunocytochemical, retrograde labeling, and developmental studies of hippocampal neurons. *Microsc Res Tech* 23:306–323.
- Frotscher M, Leranth C, Lubbers K, Oertel WH (1984). Commissural afferents innervate glutamate decarboxylase immunoreactive nonpyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett* 46: 137-143.
- Frotscher M, Schlandler M, Leranth C (1986). Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* 246:293-301.
- Frotscher M, Seress L, Schwerdtfeger WK, Buhl E (1991). The mossy cells of fascia dentate—a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol* 312:145-163.
- Frotscher M, Zimmer J (1983a). Commissural fibers terminate on nonpyramidal neurons in the guinea pig hippocampus—a combined Golgi/EM degeneration study. *Brain Res* 265:289-293.
- Frotscher M, Zimmer J (1983b). Lesion-induced mossy fibers to the inner molecular layer of the rat fascia dentata: identification of postsynaptic granule cells by the Golgi-EM technique. *J Comp Neurol* 215:299-311.
- Gaarskjaer FB (1978a). Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. I. Terminal area related to number of granule and pyramidal cells. *J Comp Neurol* 178:49–72.
- Gaarskjaer FB (1978b). Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. II. Experimental analysis of fiber distribution with silver impregnation methods. *J Comp Neurol* 178:73–88.

- Gall C (1984). Ontogeny of dynorphin-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. *Brain Res* 307:327-31.
- Gall C, Berry LM, Hodgson LA (1986). Cholecystokinin in the mouse hippocampus: localization in the mossy fiber and dentate commissural systems. *Exp Brain Res* 62:431-437.
- Gall C, Brecha N, Karten HJ, Chang KJ (1981). Localization of enkephalin-like immunoreactivity to identified axonal and neuronal populations of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 198:335-350.
- Gall C, Moore RY (1984). Distribution of enkephalin, substance P, tyrosine hydroxylase, and 5-hydroxytryptamine immunoreactivity in the septal region of the rat. *J Comp Neurol* 225:212-27.
- Garthwaite J (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14:60-67.
- Gaykema RP, van der Kuil J, Hersh LB, Luiten PG (1991). Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 43:349-60.
- Gaykema RPA, Luiten PGM, Nyakas C, Traber J (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* 293:103–124.
- Gigg J, Finch DM, O'Mara SM (2000). Responses of rat subicular neurons to convergent stimulation of lateral entorhinal cortex and CA1 in vivo. *Brain Res* 884:35-50.
- Glezer II, Hof PR and Morgane PJ (1992). Calretinin-immunoreactive neurons in the primary visual cortex of dolphin and human brains. *Brain Res* 595:181-188.
- Golomb J, de Leon MJ, Kluger A, George AE, Tarshish C, Ferris SH (1993). Hippocampal atrophy in normal aging. An association with recent memory impairment. *Arch Neurol* 50:967-73.
- Gottlieb DI, Cowan WM (1973). Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connections of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. *J Comp Neurol* 149:393–420.
- Greene JR, Lin H, Mason AJ, Johnson LR, Totterdell S (1997). Differential expression of NADPH-diaphorase between electrophysiologically-defined classes of pyramidal neurons in rat ventral subiculum, in vitro. *Neuroscience* 80:95-104.
- Greene JR, Mason A (1996). Neuronal diversity in the subiculum: correlations with the effects of somatostatin on intrinsic properties and on GABA-mediated IPSPs in vitro. *J Neurophysiol* 76:1657-66.
- Greene JRT, Totterdell S (1997) Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *J Comp Neurol* 380:395–408.
- Greenwood RS, Godar SE, Reaves TA Jr, Hayward JN (1981). Cholecystokinin in hippocampal pathways. *J Comp Neurol* 203:335-350.
- Groenewegen HJ, Vermeulen-Van Der Zee E, Te Kortschot A, Witter M (1987) Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat: a study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 23:103–120.
- Gulyás AI, Görös TJ, Freund TF (1990). Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* 37:3 144.

- Gulyás AI, Hájos N, Freund TF (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16:3397-3411.
- Gulyás AI, Miettinen R, Jacobowitz DM and Freund TF (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus -- I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fiber system. *Neuroscience* 48:1-27.
- Gulyás AI, Miles R, Hájos N, Freund TF (1993a). Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci* 5:1729-1751.
- Gulyás AI, Miles R, Sik A, Toth K, Tamamaki N, Freund TF (1993b). Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366:683-687.
- Gulyás AI, Miles R, Sik A, Tóth K, Tamamaki N, Freund TF (1993b). Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366:683-7.
- Gulyás AI, Tóth K, Danos P, Freund TF (1991b). Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 312:371-378.
- Haglund L, Swanson LW, Köhler C (1984). The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J Comp Neurol* 229:171-185.
- Hájos N, Acsády L, Freund TF (1996). Target selectivity and neurochemical characteristics of VIP-immunoreactive interneurons in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 8:1415-1431.
- Halasy K, Buhl EH, Lorinczi Z, Tamas G, Somogyi P (1996). Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 6:306-329.
- Halasy K, Miettinen R, Szabat E, Freund TF (1992). GABAergic interneurons are the major postsynaptic targets of median Raphe afferents in the rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 4:144-153.
- Halasy K, Somogyi P (1993a). Distribution of GABAergic synapses and their targets in the dentate gyrus of rat: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *J Hirnforsch* 34:299-308.
- Halasy K, Somogyi P (1993b). Subdivisions in the multiple GABAergic innervation of granule cells in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:411-429.
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:395-410.
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5:395-410.
- Handelmann G, Meyer DK, Beinfeld MC, Oertel WH (1981). CCK-containing terminals in the hippocampus are derived from intrinsic neurons: an immunohistochemical and radioimmunological study. *Brain Res* 224:180-184.
- Hansen LA, Armstrong DM, Terry RD (1987). An immunohistochemical quantification of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. *Neurobiol Aging* 8:1-6.

- Harris E, Witter MP, Weinstein G, Stewart M (2001) Intrinsic connectivity of the rat subiculum. I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborization by pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 435:490–505.
- Harris KM, Marshall PE, Landis DM (1985). Ultrastructural study of cholecystokinin-immunoreactive cells and processes in area CA1 of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 233:147-158.
- Hasegawa D, Yayoshi N, Fujita Y, Fujita M, Orima H (2005). Measurement of interthalamic adhesion thickness as a criteria for brain atrophy in dogs with and without cognitive dysfunction (dementia). *Vet Radiol Ultrasound* 46:452-7.
- Haug FM (1976) Sulphide silver pattern and cytoarchitectonics of parahippocampal areas in the rat. Special reference to the subdivision of area entorhinalis (area 28) and its demarcation from the pyriform cortex. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 52:3–73.
- Head E (2013). A canine model of human aging and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1832:1384-9.
- Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW (2002). Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J Neurochem* 82: 375–381.
- Hendry SHC, Jones EG, Emson PC, Lawson DEM, Heizmann CW and Streit P (1989). Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 76:467-472.
- Herkenham M (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol* 177:589–610.
- Hjorth-Simonsen A, Jeune B (1972). Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J Comp Neurol* 144:215–232.
- Hokfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M (1980). Peptidergic neurones. *Nature* 284:5 15-522.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2811-2814.
- Hwang IK, Yoon YS, Yoo KY, Li H, Sun Y, Choi JH, Lee CH, Huh SO, Lee YL, Won MH (2008). Sustained expression of parvalbumin immunoreactivity in the hippocampal CA1 region and dentate gyrus during aging in dogs. *Neurosci Lett* 434:99-103.
- Iritani S, Fujii M, Satoh K (1989). The distribution of substance P in the cerebral cortex and hippocampal formation: an immunohistochemical study in the monkey and rat. *Brain Res Bull* 22:295-303.
- Ishizuka N (2001) Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. *J Comp Neurol* 435:89–110.
- Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG (1995). A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 362:17–45.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580–623.
- Jacobowitz DM, Winsky L (1991). Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 304:198-218.
- Jay TM, Glowinski J, Thierry AM (1989). Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 505:337-40.
- Jay TM, Witter MP (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574-86.

- Johansson O, Hokfelt T, Elde RP (1984). Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13:265-339.
- Jones RS (1993). Entorhinal-hippocampal connections: a speculative view of their function. *Trends Neurosci* 16:58-64.
- Jongen-Rêlo AL, Pitkänen A, Amaral DG (1999). Distribution of GABAergic cells and fibers in the hippocampal formation of the macaque monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 408:237-71.
- Katona I, Acsidy L, Gulicsi A, Freund TF (1996). Somatostatin-containing cells in the rat hippocampus: connectivity and heterogeneity. *Eur J Neurosci Suppl* 9:176.
- Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K (1988b). Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 72:347-362.
- Kawaguchi Y, Hama K (1987a). Fast-spiking non-pyramidal cells in the hippocampal CA3 region, dentate gyrus and subiculum of rats. *Brain Res* 425:351-355.
- Kawaguchi Y, Hama K (1987b). Two subtypes of non-pyramidal cells in rat hippocampal formation identified by intracellular recording and HRP injection. *Brain Res* 411:190-195.
- Kelley AE, Domesick VB (1982). The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7:2321-35.
- Kempermann G, Kuhn G, Gage FH (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386:493-495.
- Khachaturian ZS (1987). Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol Aging* 8:345-346.
- Khachaturian ZS (1994). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747:1-11.
- Killiany RJ, Moss MB, Albert MS, Sandor T, Tieman J, Jolesz F (1993). Temporal lobe regions on magnetic resonance imaging identify patients with early Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 50:949-54.
- Kimotsuki T, Nagaoka T, Yasuda M, Tamahara S, Matsuki N, Ono K (2005). Changes of magnetic resonance imaging on the brain in beagle dogs with aging. *J Vet Med Sci* 67:961-7.
- Kimotsuki T, Nagaoka T, Yasuda M, Tamahara S, Matsuki N, Ono K. (2005). Changes of magnetic resonance imaging on the brain in beagle dogs with aging. *J Vet Med Sci* 67:961-7.
- Kishi K, Stanfield BB, Cowan WM (1980). A quantitative EM autoradiographic study of the commissural and associational connections of the dentate gyrus in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 160:173-86.
- Kiss J, Csaki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranth C (2000). The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [<sup>3</sup>H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* 97:657-669.
- Kjonigsen LJ, Leergaard TB, Witter MP, Bjaalie JG (2011). Digital atlas of anatomical subdivisions and boundaries of the rat hippocampal region. *Front Neuroinform* 5:2.

- Kloosterman F, Witter Menno P, van Haeften T (2003) Topographical and laminar organization of subicular projections to the parahippocampal region of the rat. *J Comp Neurol* 455: 156–171.
- Kohler C (1982). Distribution and morphology of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive neurons in regio superior of the rat hippocampal formation. *Neurosci Lett* 33:265-270.
- Kohler C (1983). Morphological analysis of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactive neurons in the area dentata of the rat brain. *J Comp Neurol* 221:247-262.
- Köhler C (1985). Intrinsic projections of the retrohippocampal region in the rat brain. I. The subicular complex. *J Comp Neurol* 236:504-22.
- Kohler C, Chan-Palay V (1982). Somatostatin-like immunoreactive neurons in the hippocampus: an immunohistochemical study in the rat. *Neurosci Lett* 34:259-264.
- Kohler C, Eriksson L, Davies S, Chan-Palay V (1986). Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *J Comp Neurol* 244:384-400.
- Kohler C, Eriksson LG, Davies S, Chan-Palay V (1987). Co-localization of neuropeptide tyrosine and somatostatin immunoreactivity in neurons of individual subfields of the rat hippocampal region. *Neurosci Lett* 78: 1-6.
- Köhler C, Steinbusch H (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience* 7:951–975.
- Köhler C, Swanson LW, Haglund L, Wu JY (1985). The cytoarchitecture, histochemistry and projections of the tuberomammillary nucleus in the rat. *Neuroscience* 16:85-110.
- Kosaka T (1983a). Axon initial segments of the granule cell in the rat dentate gyrus: synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Res* 274:129-134.
- Kosaka T (1983b). Gap junctions between non-pyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions). *Brain Res* 271:157-161.
- Kosaka T, Hama K, Wu JY (1984). GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. *Brain Res* 293:353-359.
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987). GABAergic neurons containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419:119-130.
- Kosaka T, Kosaka K, Tateishi K, Hamaoka Y, Yanaihara N, Wu JY, Hama K (1985). GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 239:420-430.
- Kosaka T, Wu JY, Benoit R (1988b). GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Exp Brain Res* 71:388-398.
- Kosel KC, Van Hoesen GW, Rosene DL (1983). A direct projection from the perirhinal cortex (area 35) to the subiculum in the rat. *Brain Res* 269:347-51.
- Krettek JE, Price JL (1977). Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. *J Comp Neurol* 172:723-52.
- Kruman, Mattson MP (1999). Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J Neurochem* 72:529–540.
- Kuffler SW (1960). Excitation and inhibition in single nerve cells. *Harvey Lect* 54:176.

- Kunkel DD, Lacaille JC, Schwartzkroin PA (1988). Ultrastructure of stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. *Synapse* 2:382-394.
- Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1988). Ultrastructural characterization and GAD co-localization of somatostatin-like immunoreactive neurons in CA1 of rabbit hippocampus. *Synapse* 2:371-381.
- Laatsch RH, Cowan WM (1967). Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. II. Degeneration of commissural afferents. *J Comp Neurol* 130:241-262.
- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1987). Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7:1979-1993.
- Lacaille J-C, Schwartzkroin PA (1988a). Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *J Neurosci* 8:1400-1410.
- Lacaille J-C, Schwartzkroin PA (1988b). Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. intrasomatic and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J Neurosci* 8:1411-1424.
- LaFrance R, Brustovetsky N, Sherburne C, Delong D, Dubinsky JM (1985). Age-related changes in regional brain mitochondria from Fischer 344 rats. *Aging Cell* 4:139-145.
- Landfield PW (1987). 'Increased calcium-current' hypothesis of brain aging. *Neurobiol Aging* 8:346-347.
- Laurberg S (1979). Commissural and intrinsic connections of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 184:685-708.
- Laurberg S, Sorensen KE (1981). Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Res* 212:287-300.
- Leranath C, Frotscher M (1986). Synaptic connections of cholecystokinin-immunoreactive neurons and terminals in the rat fascia dentata: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 254:51-64.
- Leranath C, Frotscher M (1987). Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol* 261:33-47.
- Leranath C, Frotscher M, Tombol T, Palkovits M (1984). Ultrastructure and synaptic connections of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive non-pyramidal neurons and axon terminals in the rat hippocampus. *Neuroscience* 12:531-542.
- Leranath C, Malcolm AJ, Frotscher M (1990). Afferent and efferent synaptic connections of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata. *J Comp Neurol* 295:111-122.
- Leranath C, Ribak CE (1991). Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: a possible key to this region's resistance to epileptic damage. *Exp Brain Res* 85: 129-136.
- Leslie SW, Chandler LJ, Barr EM, Farrar RP (1985). Reduced calcium uptake by rat brain mitochondria and synaptosomes in response to aging. *Brain Res* 329:177-183.
- Li X-G, Somogyi P, Tepper JM, Buzsáki G (1992). Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res* 90:519-525.
- Li X-G, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki G (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339:181-208.

- Lin H1, Totterdell S (1998). Light and electron microscopic study of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the rat subiculum. *J Comp Neurol* 395:195-208.
- Lingenhöhl K, Finch DM (1991). Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains. *Exp Brain Res*; 84:57-74.
- Ljungdahl A, Hokfelt T, Nilsson G (1978). Distribution of substance P-immunoreactivity in the central nervous system of the rat--1. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3:861-943.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AHM (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 70:453-511.
- Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, Bjorklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F (1979). Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4:1953-1976.
- Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18:307-319.
- Lubke J, Deller T, Frotscher M (1997). Septal innervation of mossy cells in the hilus of the rat dentate gyrus: an anterograde tracing and intracellular labeling study. *Exp Brain Res* 114:423-432.
- Magloczky Z, Acsady L, Freund TF (1994). Principal cells are the post-synaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 4:322-334.
- Marksteiner J, Wahler R, Bellmann R, Order M, Krause JE, Sperk G (1992). Limbic seizures cause pronounced changes in the expression of neurokinin B in the hippocampus of the rat. *Neuroscience* 49:383-395.
- McBain CJ (1994). Hippocampal inhibitory neuron activity in the elevated potassium model of epilepsy. *J Neurophysiol* 72: 1-11.
- McGinty JF, Henriksen SJ, Goldstein A, Terenius L, Bloom FE (1983). Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:589-93.
- Meibach RC, Siegel A (1975). The origin of fornix fibers which project to the mammillary bodies in the rat: a horseradish peroxidase study. *Brain Res* 88:508-512.
- Meibach RC, Siegel A (1977). Thalamic projections of the hippocampal formation: evidence for an alternate pathway involving the internal capsule. *Brain Res* 134:1-12.
- Mesulam MM (1999). Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. *Neuron* 24: 521-529.
- Miettinen R, Gulyás AI, Baimbridge KG, Jacobowitz DM, Freund TF (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus-11. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA. *Neuroscience* 48:29-43.
- Mikkonen M, Alafuzoff I, Tapiola T, Soininen H, Miettinen R (1999). Subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28K immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92:515-532.
- Mikkonen M, Soininen H, Pitkanen A (1997). Distribution of parvalbumin-, calretinin-, and calbindin-D28K-immunoreactive neurons and fibers in the human entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 388:64-88.

- Miles R, Tóth K, Gulyás AI, Hájos N, Freund TF (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:815-823.
- Miller DB and O'Callahan JP (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Res Rev* 4: 123–140.
- Milner TA, Bacon CE (1989b). Ultrastructural localization of somatostatin-like immunoreactivity in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 290:544-560.
- Milner TA, Veznedaroglu E (1992). Ultrastructural localization of neuropeptide-Y-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *Hippocampus* 2: 107-126.
- Misgeld U, Frotscher M (1986). Postsynaptic-GABAergic inhibition of non-pyramidal neurons in the guinea-pig hippocampus. *Neuroscience* 19:193-206.
- Molinari S, Battini R, Ferrari S, Pozzi L, Killcross AS, Robbins TW, Jouvenceau A, Billard JM, Dutar P, Lamour Y, Baker WA, Cox H and Emson PC (1996). Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93: 8028–8033.
- Molinari S, Battini R, Ferrari S, Pozzi L, Killcross AS, Robbins TW, Jouvenceau A, Billard JM, Dutar P, Lamour Y, Baker WA, Cox H, Emson PC (1996). Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8028–8033.
- Montone KT, Fass B, Hamill GS (1988). Serotonergic and nonserotonergic projections from the rat interpeduncular nucleus to the septum, hippocampal formation and raphe: A combined immunocytochemical and fluorescent retrograde labelling study of neurons in the apical subnucleus. *Brain Res* 20: 233-240.
- Moore RY, Halaris AE (1975). Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J Comp Neurol* 164:171–184.
- Morrison JH, Benoit R, Magistretti PJ, Ling N, Bloom FE (1982). Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin-related peptides in hippocampus. *Neurosci Lett* 34: 137-142.
- Mosko S, Lynch G, Cotman CW (1973). The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat. *J Comp Neurol* 152:163–174.
- Moyer JR Jr Disterhoft JF (1994). Nimodipine decreases calcium action potentials in rabbit hippocampal CA1 neurons in an age-dependent and concentration-dependent manner. *Hippocampus* 4:11–17.
- Moyer JR Jr, Thompson LT, Black JP, Disterhoft JF (1992). Nimodipine increases excitability of rabbit CA1 pyramidal neurons in an age- and concentration-dependent manner. *J Neurophysiol* 68:2100–2109.
- Moyer JR, Furtak SC, McGann JP, Brown TH (2011). Aging-related changes in calcium-binding proteins in rat perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* 32:1693-706.
- Murphy DG, DeCarli C, Schapiro MB, Rapoport SI, Horwitz B (1992). Age-related differences in volumes of subcortical nuclei, brain matter, and cerebrospinal fluid in healthy men as measured with magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 49:839-45.
- Naber PA, da Silva FHL, Witter MP (2001) Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* 11:99–104.
- Naber PA, Witter MP (1998) Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 393:284–297.

- Nafstad PHJ (1967). An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Z Zellforsch Und Mikrosk Anat* 76:532–542.
- Nicholls DG (1985). A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog Brain Res* 63:97–106.
- Nitsch R and Ohm TG (1995). Calrerinin immunoreacrive structures in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 360:475-487.
- Nitsch R, Leranath C, Frotscher M (1990a). Most somatosratin-immunoreactive neurons in the rat fascia dentata do not contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res* 528:327-329.
- Nitsch R, Soriano E, Frotscher M (1990b). The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. *Anat Embryo* 181 :413-425.
- Nolte J. Origin and course of the fornix, Fig 16- 10A. In: *The human brain*. 3rd ed. St Louis, Mo: Mosby Yearbook, 1993; 402.
- Nunzi MG, Gorio A, Milan F, Freund TF, Somogyi P, Smith AD (1985). Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J Comp Neurol* 237:485-505.
- Nyakas C, Luiten PGM, Spencer DG, Traber J (1987). Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull* 18:533–545.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64:129–155.
- Paakkari I, Lindsberg P (1995). Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 27:369-377.
- Papez JW (1937). A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry* 38:725–743.
- Paxinos G, Watson CR, Emson PC (1980). AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 3:129-49.
- Perry DC, Wei H, Rosenthal RE, Fiskum G (1994). Autoradiographic analysis of L- and N-type voltage-dependent calcium channel binding in canine brain after global cerebral ischemia/reperfusion. *Brain Res* 657: 65–72.
- Pickel VM, Segal M, Bloom FE (1974). A radioautographic study of the efferent pathways of the nucleus locus coeruleus. *J Comp Neurol* 155:15–42.
- Pitkänen A and Amaral DG (1993). Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: the hippocampal formation. *J Comp Neurol* 331:37-74.
- Potier B, Krzywkowski P, Lamour Y and Duter P (1994). Loss of calbindin-immunoreactivity in CA1 hippocampal stratum radiatum and stratum lacunosum-moleculare interneurons in the aged rat. *Brain Res* 661: 181–188.
- Powell TPS, Guillery RW, Cowan WM (1957) A quantitative study of the fornix-mamillo-thalamic system. *J Anat* 91:419–437.
- Pugliese M, Carrasco JL, Geloso MC, Mascort J, Michetti F and Mahy N (2004).  $\gamma$  Aminobutyric acidergic interneuron vulnerability to aging in canine prefrontal cortex. *J. Neurosci Res* 77: 913–920.
- Pugliese M, Carrasco JL, Gomez-Anson B, Andrade C, Zamora A, Rodríguez MJ, Mascort J, Mahy N (2010). Magnetic resonance imaging of cerebral involuntional

changes in dogs as markers of aging: an innovative tool adapted from a human visual rating scale. *Vet J* 186:166-71.

- Pugliese M, Carrasco JL, Gomez-Anson B, Andrade C, Zamora A, Rodríguez MJ, Mascort J, Mahy N (2010). Magnetic resonance imaging of cerebral involuntional changes in dogs as markers of aging: an innovative tool adapted from a human visual rating scale. *Vet J* 186:166-71.
- Pyapali GK, Sik A, Penttonen M, Buzsaki G, Turner DA (1998). Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J Comp Neurol* 391:335–352.
- Raisman G, Cowan WM, Powell TPS (1965). The extrinsic afferent, commissural and association fibres of the hippocampus. *Brain* 88:963–997.
- Ramón y Cajal S (1893). Estructura del asta de Ammon y fascia dentata. *Ann Soc Esp Hist Nat* 22.
- Rapp PR, Gallagher M (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9926–9930.
- Resibois A, Rogers JH (1992). Calretinin in rat brain-an immunohistochemical study. *Neuroscience* 46: 101-134.
- Ribak CE, Nitsch R and Seress L (1990). Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. *Y Comp Neurol* 300:449-461.
- Ribak CE, Seress L (1983). Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:577–597.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14:835-857.
- Ribak CE, Seress L, Peterson GM, Seroogy KB, Fallon JH, Schmued LC (1986). A GABAergic inhibitory component within the hippocampal commissural pathway. *J Neurosci* 6:3492-3498.
- Ribak CE, Vaughn JE, Barber RP (1981). Immunocytochemical localization of GABAergic neurons at the electron microscopical level. *Histochemistry* 13:555-582.
- Ribak CE, Vaughn JE, Saito K (1978). Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res* 140:315–332.
- Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ (1984). Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience* 11:35-77.
- Rogers JH (1992). Immunohistochemical markers in rat cortex-co-localization of calretinin and calbindin-d28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res* 587:147-157.
- Rogers JH and Résibois A (1992). Calretinin and calbindin-D28 k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 51:843-865.
- Rosenthal RE, Williams R, Bogaert YE, Getson PR, Fiskum G (1992). Prevention of postischemic canine neurological injury through potentiation of brain energy metabolism by acetyl-L-carnitine. *Stroke* 23: 1312–1318.
- Ruit KG, Neafsey EJ (1990). Hippocampal input to a "visceral motor" corticobulbar pathway: an anatomical and electrophysiological study in the rat. *Exp Brain Res* 82:606-16.
- Rusinek H, de Leon MJ, George AE, Stylopoulos LA, Chandra R, Smith G, Rand T, Mourino M, Kowalski H (1991). Alzheimer disease: measuring loss of cerebral gray matter with MR imaging. *Radiology* 178:109-14.

- Scharfman HE (1995). Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *J Neurophysiol* 74:179-194.
- Scharfman HE, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1990). Synaptic connections of dentate granule cells and hilar neurons: results of paired intracellular recordings and intracellular horseradish peroxidase injections. *Neuroscience* 37:693-707.
- Scharfman HE, Witter MP, Schwarcz R (2000). The parahippocampal region Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction *Ann NY Acad Sci* 911:ix-xiii.
- Seress L (1988). Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch* 29:335-340.
- Seress L, Gulyás AI and Freund TF (1991). Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 313: 162-177.
- Seress L, Gulyás AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E and Freund TF (1993a). Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin-D28k immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 337: 208-230.
- Seress L, Leranth C (1996). Distribution of substance P-immunoreactive neurons and fibers in the monkey hippocampal formation. *Neuroscience* 71:633-650.
- Seress L, Nitsch R and Leranth C (1993b). Calretinin immunoreactivity in the monkey hippocampal formation -- I. Light and electron microscopic characteristics and co-localization with other calcium-binding proteins. *Neuroscience* 55: 775-796.
- Seress L, Pokorny J (1981). Structure of the granular layer of the rat dentate gyrus: a light microscopic and Golgi study. *J Anat* 133:181-195.
- Seress L, Ribak CE (1983). GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp Brain Res* 50:173-182.
- Seress L, Ribak CE (1984). Direct commissural connections to the basket cells of the hippocampal dentate gyrus: anatomical evidence for feed-forward inhibition. *J Neurocytol* 13:215-225.
- Seress L, Ribak CE (1985). A combined Golgi-electron microscopic study of non-pyramidal neurons in the CA1 area of the hippocampus. *J Neurocytol* 14:717-730.
- Seress L, Ribak CE (1990a). Postnatal development of the light and electron microscopic features of basket cells in the hippocampal dentate gyrus of the rat. *Anat Embryol* 181:547-565.
- Seress L, Ribak CE (1990b). The synaptic connections of basket cell axons in the developing rat hippocampal formation. *Exp Brain Res* 81:500-508.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213-42.
- Siegel A, Edinger H, Ogami S (1974). The topographical organization of the hippocampal projection to the septal area: a comparative neuroanatomical analysis in the gerbil, rat, rabbit, and cat. *J Comp Neurol* 157:359-77.
- Siegel A, Ohgami S, Edinger H (1975). Projections of the hippocampus to the septal area in the squirrel monkey. *Brain Res* 99:247-60.

- Sik A, Minen A, Penttonen M, Buzsáki G (1994). Inhibitory CA1-CA3-hilar region feedback in the hippocampus. *Science* 265: 1722-1724.
- Sík A, Penttonen M, Buzsáki G (1997). Interneurons in the dentate gyrus: An in vivo intracellular labeling study. *Eur J Neurosci* 9:573-588.
- Sík A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsáki G (1995). Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 15:6651-6665.
- Sims KB, Hoffman DL, Said SI, Zimmerman EA (1980). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* 186:165-183.
- Sisó S, Tort S, Aparici C, Pérez L, Vidal E and Pumarola M (2003). Abnormal neuronal expression of the calcium-binding proteins, parvalbumin and calbindin D-28k, in aged dogs. *J Comp Pathol* 128: 9–14.
- Sisó S, Tort S, Aparici C, Pérez L, Vidal E, Pumarola M (2003). Abnormal neuronal expression of the calcium binding proteins, parvalbumin and calbindin D-28k, in aged dogs. *J. Comp. Pathol.* 128: 9–14.
- Sloviter RS (1989). Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280:183-196.
- Sloviter RS, Nilaver G (1987). Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentata and hippocampus of the rat. *J Comp Neurol* 256:42-60.
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD (1991). Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 308:381-96.
- Snyder SH (1992). Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257:494-496.
- Soltész I, Mody I (1994). Patch-clamp recordings reveal powerful GABAergic inhibition in dentate hilar neurons. *J Neurosci* 14:2365-2376.
- Somogyi P, Freund TF, Hodgson AJ, Somogyi J, Beroukas D, Chubb IW (1985). Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus and visual cortex of the cat. *Brain Res* 332:143-149.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Chubb IW, Penke B, Erdei A (1985b). Antisera to gamma-aminobutyric acid. *J Histochem Cytochem* 33:240-248.
- Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY (1984). Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J Neurosci* 4:2590-2603.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD (1983a). A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259:137-142.
- Somogyi P, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Takagi H, Wu JY (1983b). Glutamate decarboxylase immunoreactivity in the hippocampus of the cat: distribution of immunoreactive synaptic terminals with special reference to the axon initial segment of pyramidal neurons. *J Neurosci* 3:1450-1468.

- Soriano E, Del Rio JA, Martinez A, Super H (1994). Organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. I. Immunocytochemical characterization of neuronal populations in the subplate and marginal zone. *J Comp Neurol* 342:571-595.
- Soriano E, Frotscher M (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res* 503:170-174.
- Soriano E, Frotscher M (1993b). Spiny nonpyramidal neurons in the CA3 region of the rat hippocampus are glutamate-like immunoreactive and receive convergent mossy fiber input. *J Comp Neurol* 333:435-448.
- Soriano E, Frotscher M (1994). Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus* 4:65-70.
- Soriano E, Nitsch R, Frotscher M (1990). Axo-axonic chandelier cells in the rat fascia dentata: Golgi-electron microscopy and immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 293:1-25.
- Steward O, Scoville SA (1976). Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol* 169:347-370.
- Storm-Mathisen J, Fonnum F (1972). Localization of transmitter candidates in the hippocampal region. *Prog Brain Res* 36:41-58.
- Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FMS, Ottersen OP (1983). First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature* 301 :5 17-520.
- Struble RG, Desmond NL, Levy WB (1978). Anatomical evidence for interlamellar inhibition in the fascia dentata. *Brain Res* 152:-580-585. Swanson LW (1978a). The anatomical organization of septo-hippocampal projections. In: *Functions of the septo-hippocampal system*, pp 25-48. Amsterdam: Elsevier North Holland.
- Su MY, Head E, Brooks WM, Wang Z, Muggenburg BA, Adam GE, Sutherland R, Cotman CW, Nalcioglu O (1998). Magnetic resonance imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. *Neurobiol Aging* 19:479-85.
- Su MY, Tapp PD, Vu L, Chen YF, Chu Y, Muggenburg B, Chiou JY, Chen C, Wang J, Bracco C, Head E (2005). A longitudinal study of brain morphometrics using serial magnetic resonance imaging analysis in a canine model of aging. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:389-97.
- Swanson I,W, Sawchenko PE, Cowan WM (1980). Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain Res* 197:207-212.
- Swanson LW (1983). Neuropeptides-new vistas on synaptic transmission. *Trends Neurosci* 6:3-19.
- Swanson LW, Cowan WM (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172:49-84.
- Swanson LW, Cowan, WM (1975). Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not Ammon's horn. *Science* 189:303-304.
- Swanson LW, Hartman BK (1975). The central adrenergic system: an immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine- $\beta$ -hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* 163:467-506.
- Swanson LW, Köhler C, Bjorklund A (1987) The limbic region. I. The septohippocampal system. In: *Handbook of chemical neuroanatomy* (Bjorklund A, Hökfelt T, Swanson LW, eds), pp 125-227. Amsterdam: Elsevier.

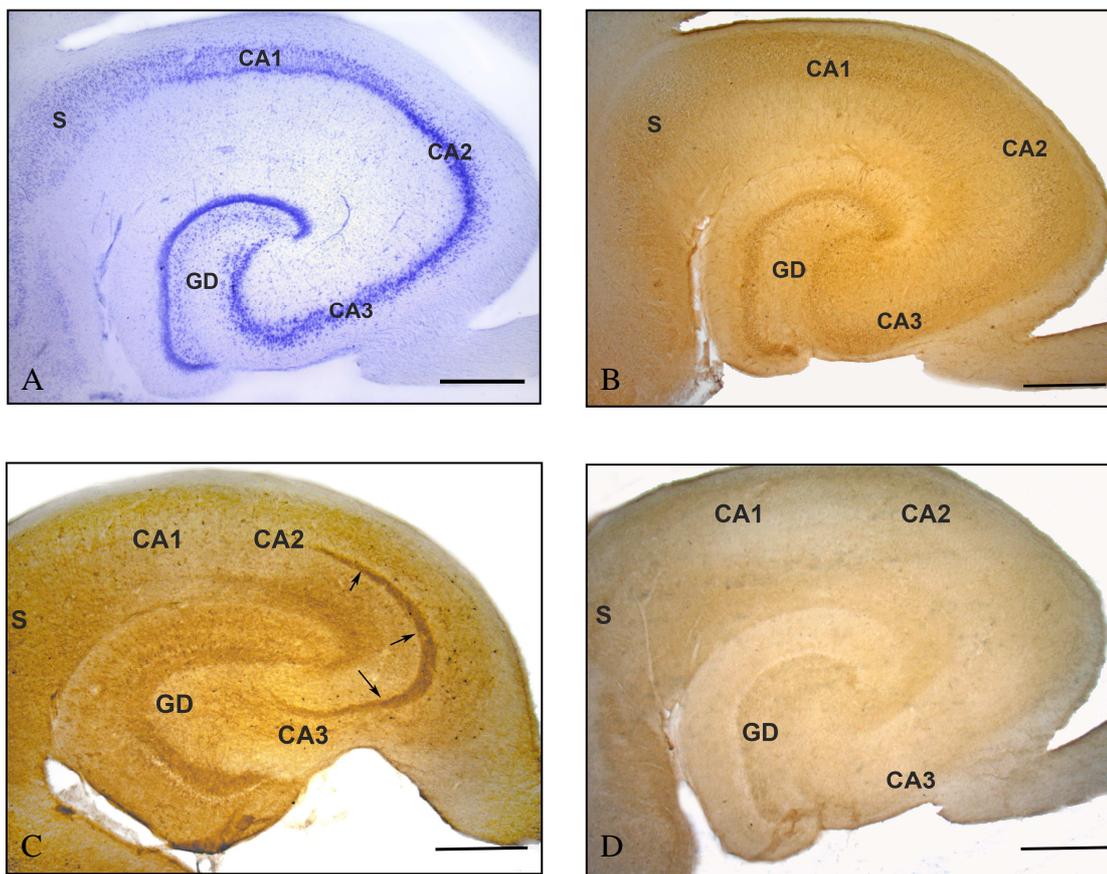
- Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM (1981). Evidence for collateral projections by neurons in ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. *J Neurosci* 1:548–559.
- Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol* 181:681–716.
- Tamamaki N, Abe K, Nojyo Y (1987). Columnar organization in the subiculum formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *Brain Res* 412:156–160.
- Tamamaki N, Abe K, Nojyo Y (1988). Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique. *Brain Res* 452:255–72.
- Tamamaki N, Nojyo Y (1993) Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* 3:471–480.
- Tamamaki N, Watanabe K, Nojyo Y (1984). A whole image of the hippocampal pyramidal neuron revealed by intracellular pressure-injection of horseradish peroxidase. *Brain Res* 307:336–40.
- Thibault O, Hadley R, Landfield PW (2001). Elevated postsynaptic  $[Ca^{2+}]_i$  and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity. *J Neurosci* 21:9744–9756.
- Thibault O, Landfield PW (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272:1017–1020.
- Thibault O, Porter NM, Chen KC, Blalock EM, Kaminker PG, Clodfelter GV, Brewer LD, Landfield PW (1998). Calcium dysregulation in neuronal aging and Alzheimer's disease: history and new directions. *Cell Calcium* 24:417–433.
- Thomson and Hahn (2012). *Veterinary Neuroanatomy: A Clinical Approach*. Saunders Elsevier.
- Tóth K, Freund TF (1992). Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49:793–805.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Kharazia VN, Nakane M, Schmidt H (1993). Neurons in rat hippocampus that synthesize nitric oxide. *J Comp Neurol* 331:111–121.
- van Groen T, Kadish I, Wyss JM (2002). Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Res Bull* 57:553–556.
- van Groen T, Miettinen P, Kadish I (2003). The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13:133–149.
- van Groen T, Wyss JM (1988). Species differences in hippocampal commissural connections: studies in rat, guinea pig, rabbit, and cat. *J Comp Neurol* 267:322–34.
- van Groen T, Wyss JM (1990a). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol* 302:515–528.
- van Groen T, Wyss JM (1990a). The connections of presubiculum and parasubiculum in the rat. *Brain Res* 518:227–243.
- Veng LM, Mesches MH, Browning MD (2003). Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein  $\alpha_1D$  (Cav1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 110:193–202.

- Vertes RP (1992). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:595-622.
- Vertes RP (1993). PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:595-622.
- Vertes RP, Fortin WJ, Crane AM (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 407:555-582.
- Villa A, Podini P, Panzeri MC, Racchetti G and Meldolesi J (1994). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum. *Eur J Neurosci* 6: 1491-1499.
- Villa A, Podini P, Panzeri MC, Racchetti G, Meldolesi J (1994). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum. *Eur J Neurosci* 6: 1491-1499.
- Vogt BA, Miller MW (1983). Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. *J Comp Neurol* 216:192-210.
- Wainer BH, Levey AI, Rye DB, Mesulam MM, Mufson EJ (1985). Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett* 54:45-52.
- West CD (1979). A quantitative study of lipofuscin accumulation with age in normals and individuals with Down's syndrome, phenylketonuria, progeria and transneuronal atrophy. *J Comp Neurol* 186:109-16.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497.
- White TD, Tan AM, Finch DM (1990) Functional reciprocal connections of the rat entorhinal cortex and subicular complex with the medial frontal cortex: an in vivo intracellular study. *Brain Res* 533:95-106.
- Williams S, Samulack DD, Beaulieu C, Lacaille JC (1994). Membrane properties and synaptic responses of interneurons located near the stratum lacunosum-moleculare/radiatum border of area CA1 in whole-cell recordings from rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 71:2217-2235.
- Witter MP (1993) Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3:33-44.
- Witter MP, Daelmans HE, Jorritsma-Byham B, Staiger JF, Wouterlood FG (1992). Restricted origin and distribution of projections from the lateral to the medial septal complex in rat and guinea pig. *Neurosci Lett* 148:164-8.
- Witter MP, Groenewegen HJ (1990) The subiculum: cytoarchitecturally a simple structure, but hodologically complex. In: *Understanding the brain through the hippocampus* (Storm-Mathisen J, Zimmer J, Ottersen OP, eds). Amsterdam: Elsevier.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (1989b). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol* 33:161-253.
- Witter MP, Ostendorf RH, Groenewegen HJ (1990) Heterogeneity in the dorsal subiculum of the rat: distinct neuronal zones project to different cortical and subcortical targets. *Eur J Neurosci* 2:718-725.
- Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG (1989a). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9:216-28.
- Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG (1989a). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9:216-28.

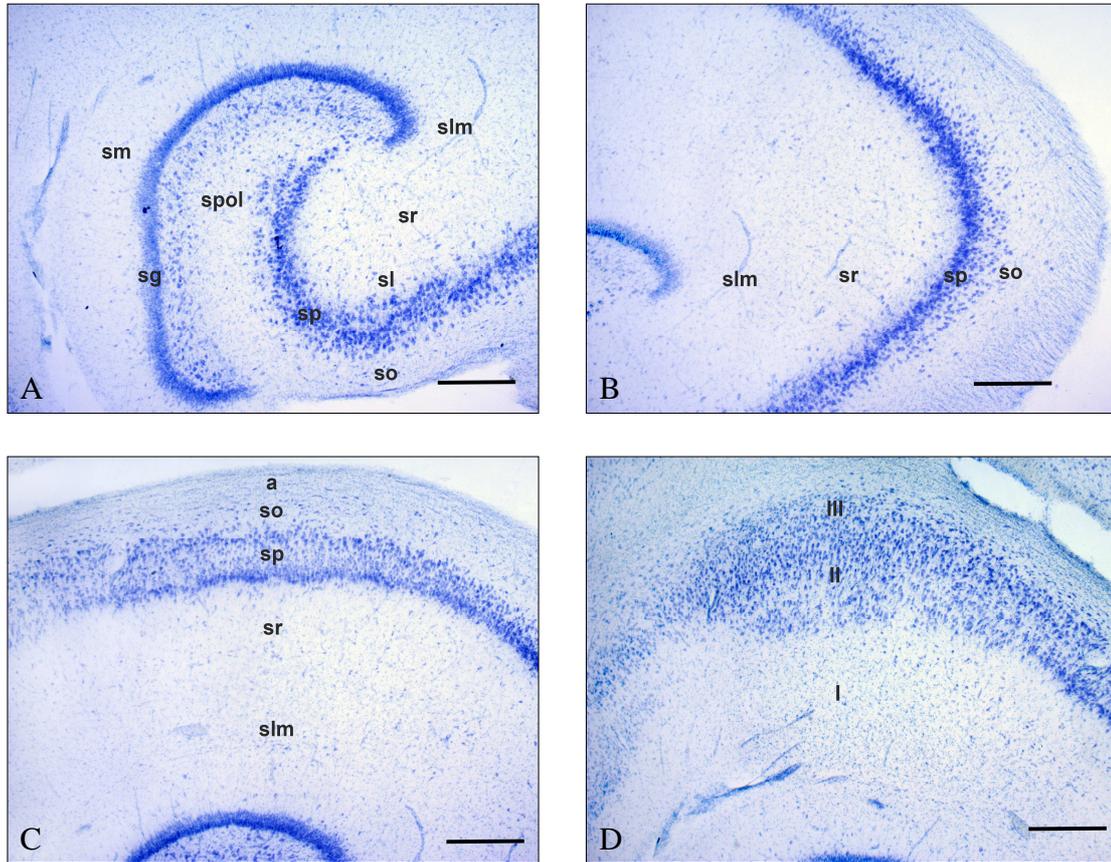
- Woodson W, Nitecka L, Ben-Ari Y (1989). Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J. Comp Neurol* 280:254-271.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179–203.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990). Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296: 179-203.
- Wouterlood FG, Tuinhof R (1992). Subicular efferents to histaminergic neurons in the posterior hypothalamic region of the rat studied with PHA-L tracing combined with histidine decarboxylase immunocytochemistry. *J Hirnforsch* 33:451-65.
- Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM (1979). Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)* 156:165–176.
- Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM (1980). The organization of the fimbria, dorsal fornix and ventral hippocampal commissure in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 158:303–316.
- Wyss JM, Van Groen T (1992) Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. *Hippocampus* 2:1–12.
- Yang S, Liu T, Li S, Zhang X, Ding Q, Que H, Yan X, Wei K and Liu S (2008). Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience* 154: 1107–1120.
- Yang S, Liu T, Li S, Zhang X, Ding Q, Que H, Yan X, Wei K, Liu S (2008). Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience* 154: 1107–1120.

**Figure**

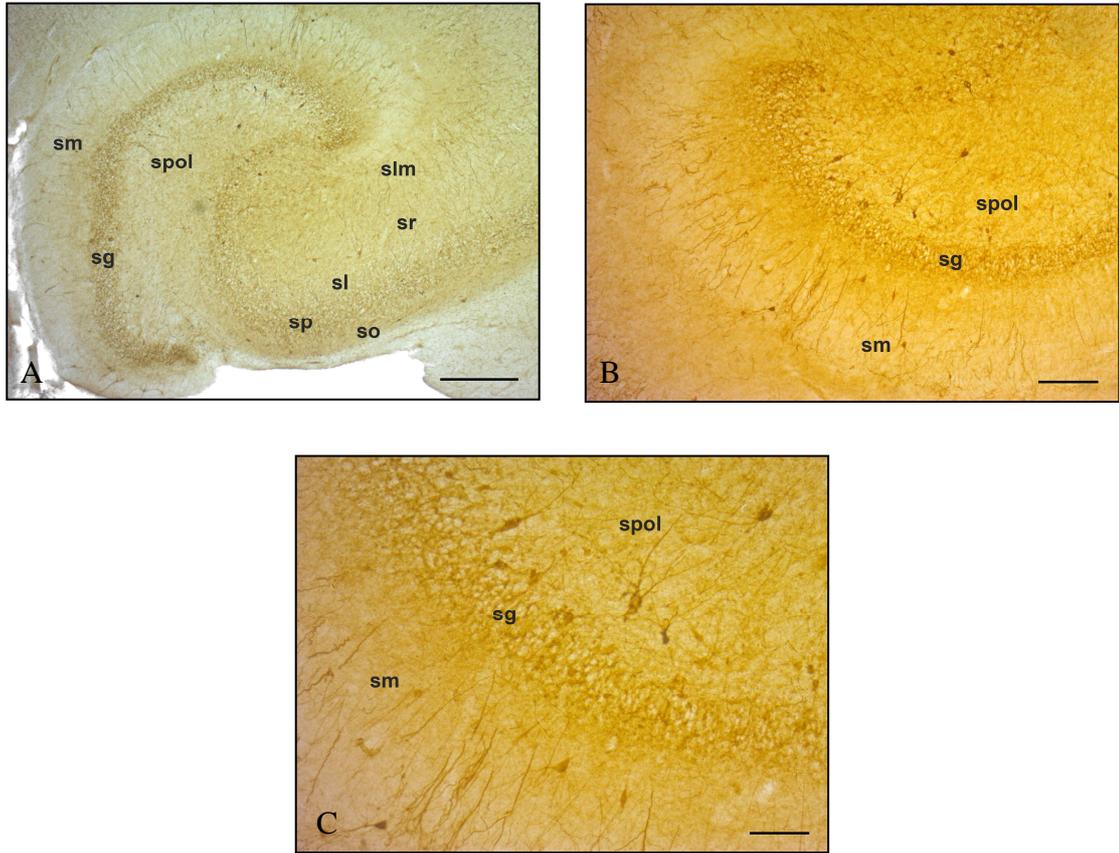




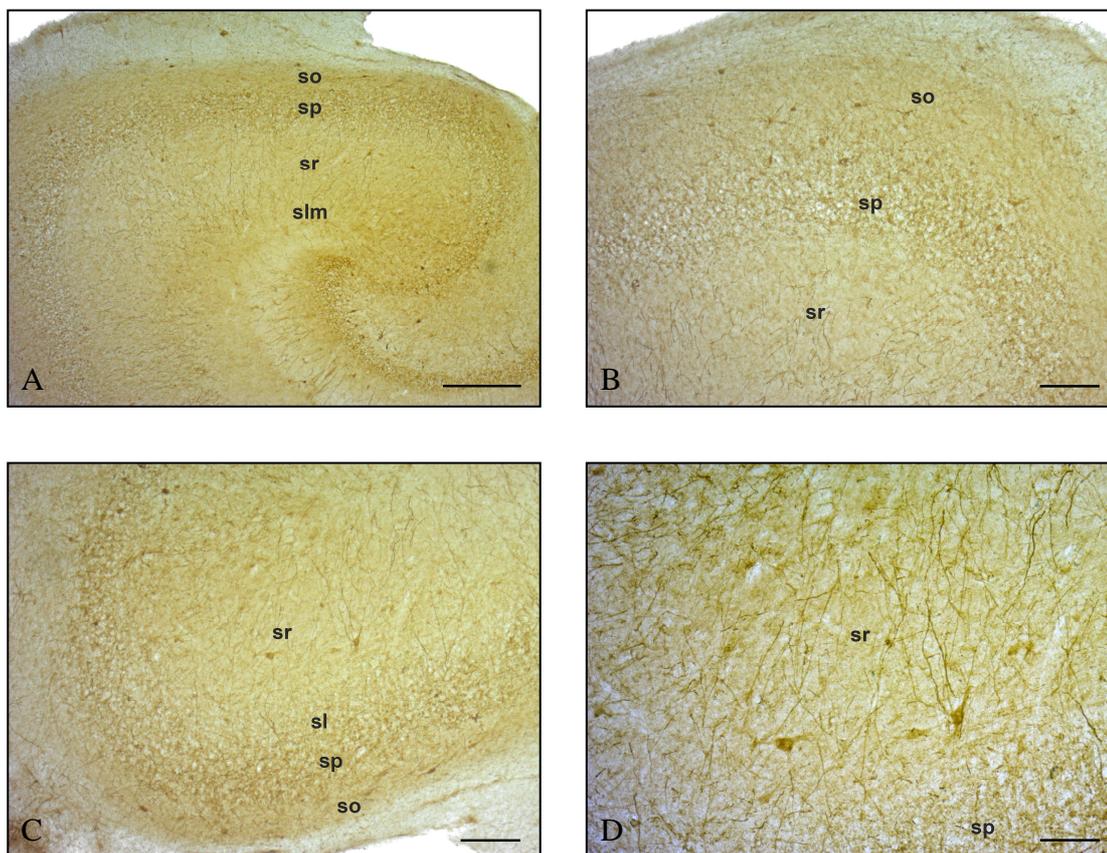
**Figura 1.** Formazione ippocampale di cane. (A) Organizzazione anatomica (colorazione con la tionina). Notare la presenza del giro dentato, dell'ippocampo propriamente detto (campi CA3, CA2 e CA1) e del subicolo. Distribuzione dell'immunoreattività per la parvalbumina (B), la calbindina-D28k (C) e la calretinina (D). In C le frecce indicano le fibre musciate calbindina-D28k-immunoreattive. Abbreviazioni: GD, giro dentato; CA3, CA2 e CA1 (campi dell'ippocampo propriamente detto); S, subicolo. Barra: 1000  $\mu\text{m}$  (A-D).



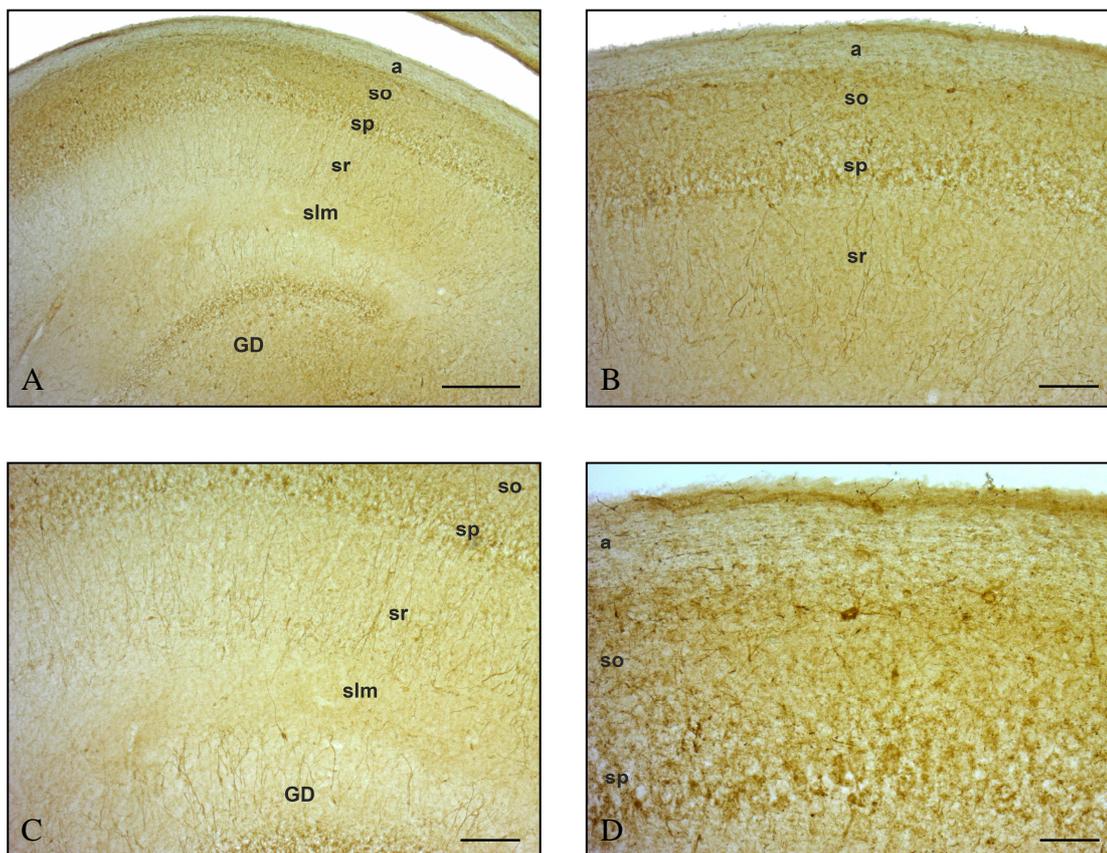
**Figura 2.** Citoarchitettura della formazione ippocampale di cane. (A) Giro dentato e campo CA3, (B) campo CA3, (C) campo CA1 e (D) subicolo. Abbreviazioni: a, alveo; sg, strato dei granuli; slm, strato lacunoso-molecolare; sl, strato lucido; sm, strato molecolare; so, strato oriens; sp, strato piramidale; spol, strato polimorfo; sr, strato radiato; I, II, III, strati del subicolo. Colorazione tionina. Barra: 500  $\mu$ m (A-D).



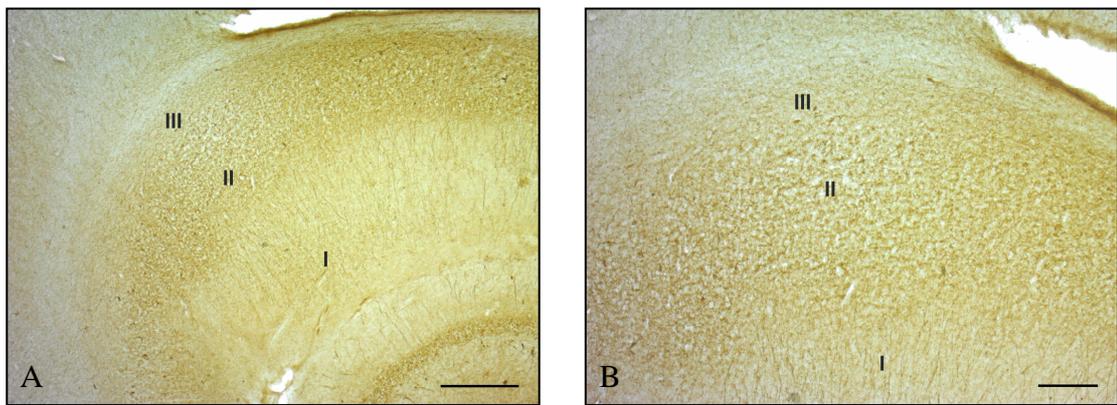
**Figura 3.** Distribuzione dell'immunoreattività per la parvalbumina nel giro dentato di cane. Notare i numerosi basket parvalbumina-immunoreattivi presenti nello strato dei granuli (A-C). Sono evidenti i neuroni di grandi dimensioni parvalbumina-immunoreattivi presenti nello strato polimorfo ed i dendriti immunopositivi presenti nello strato molecolare (B e C). Abbreviazioni: sg, strato dei granuli; slm, strato lacunoso-molecolare (campo CA3); sl, strato lucido (campo CA3); sm, strato molecolare; so, strato oriens (campo CA3); sp, strato piramidale (campo CA3); spol, strato polimorfo; sr, strato radiato (campo CA3). Barra: 500  $\mu\text{m}$  in A; 200  $\mu\text{m}$  in B; 100  $\mu\text{m}$  in C.



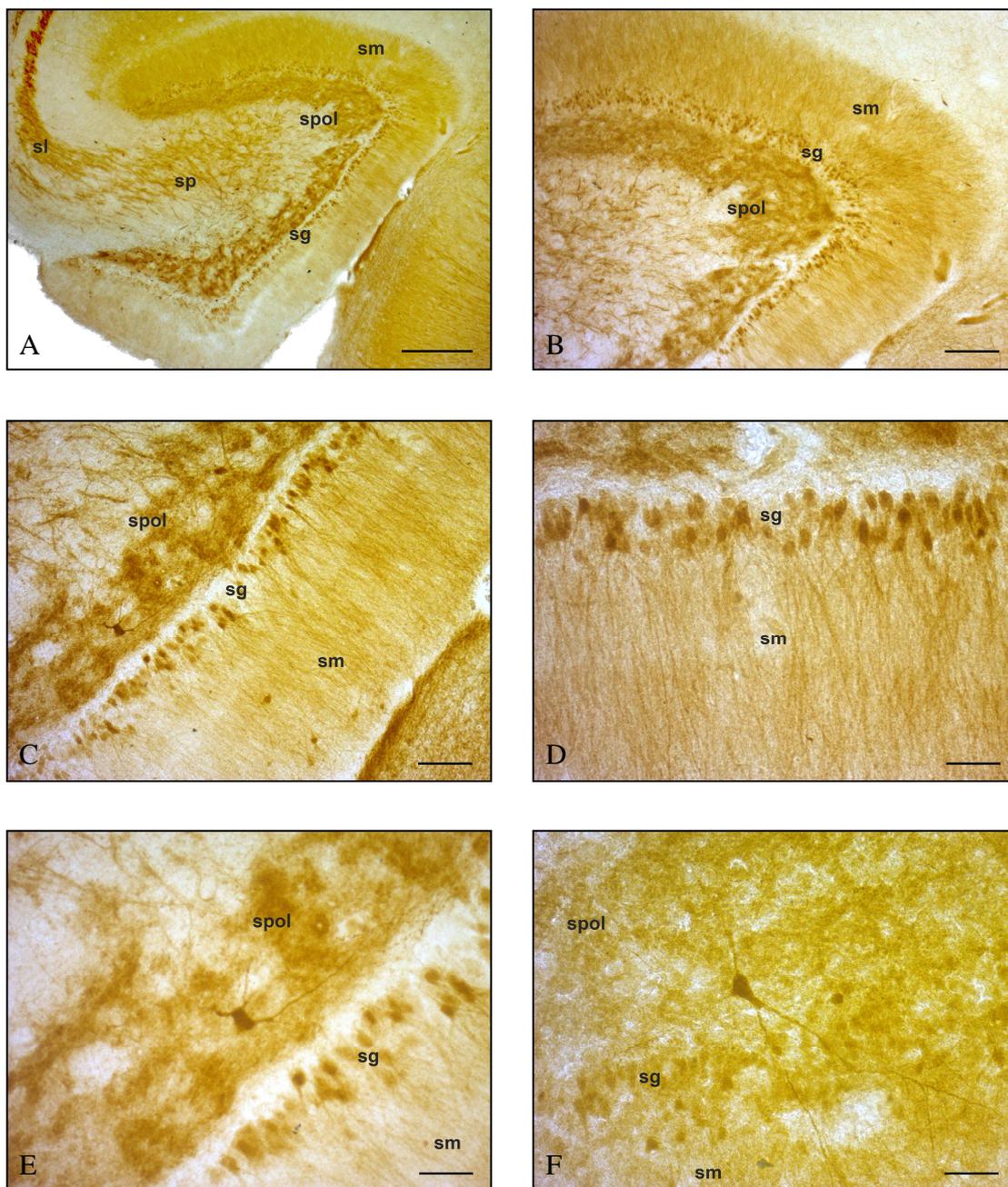
**Figura 4.** Distribuzione dell'immunoreattività per la parvalbumina nel campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto di cane. Numerosi basket parvalbumina-immunoreattivi sono presenti nello strato piramidale (A-C). Notare la presenza di neuroni immunoreattivi negli strati oriens e radiato (B-D). Dendriti immunopositivi sono presenti nello strato radiato (C e D). Abbreviazioni: slm, strato lacunosomolecolare; sl, strato lucido; so, strato oriens; sp, strato piramidale; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu\text{m}$  in A; 200  $\mu\text{m}$  in B e C; 100  $\mu\text{m}$  in D.



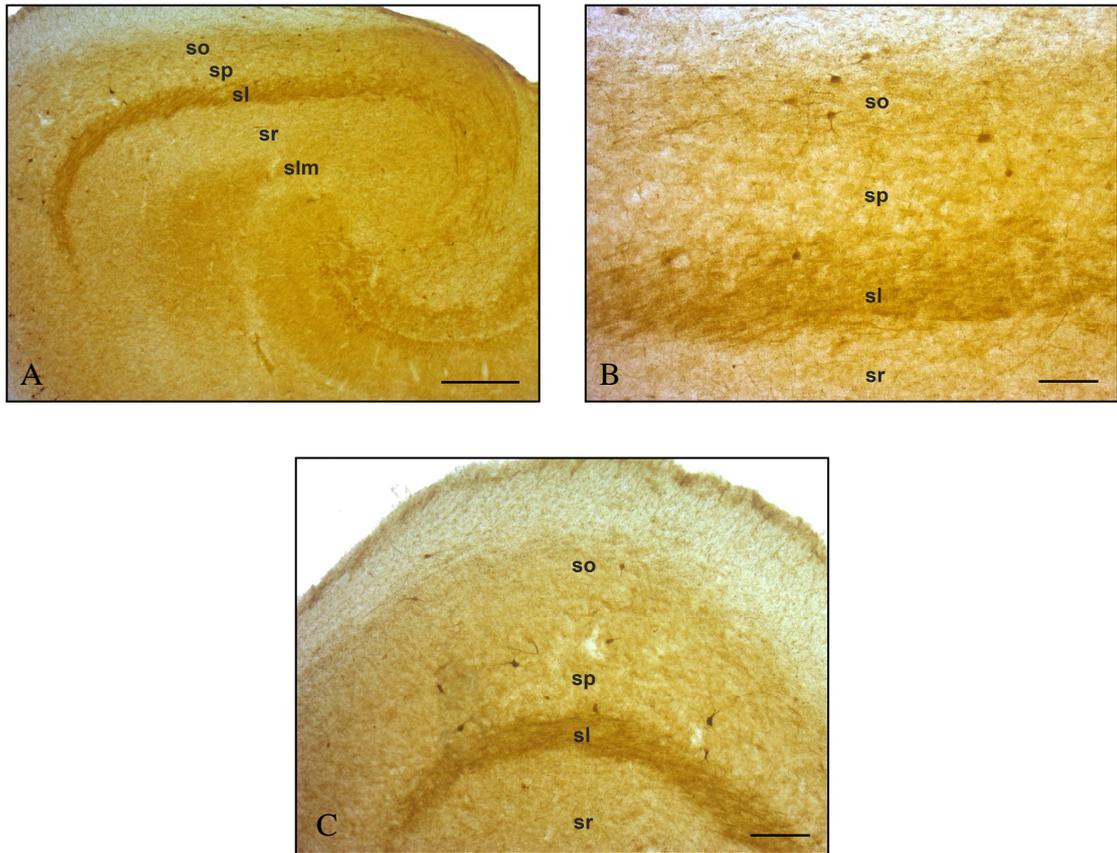
**Figura 5.** Distribuzione dell'immunoreattività per la parvalbumina nel campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto di cane. Numerosi basket parvalbumina-immunoreattivi sono presenti nello strato piramidale (A-D). Notare la presenza di neuroni immunoreattivi negli strati oriens e radiato (B-D). Dendriti immunopositivi sono presenti nello strato radiato (B e C). Abbreviazioni: slm, strato lacunosomolecolare; sl, strato lucido; so, strato oriens; sp, strato piramidale; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu$ m in A; 200  $\mu$ m in B e C; 100  $\mu$ m in D.



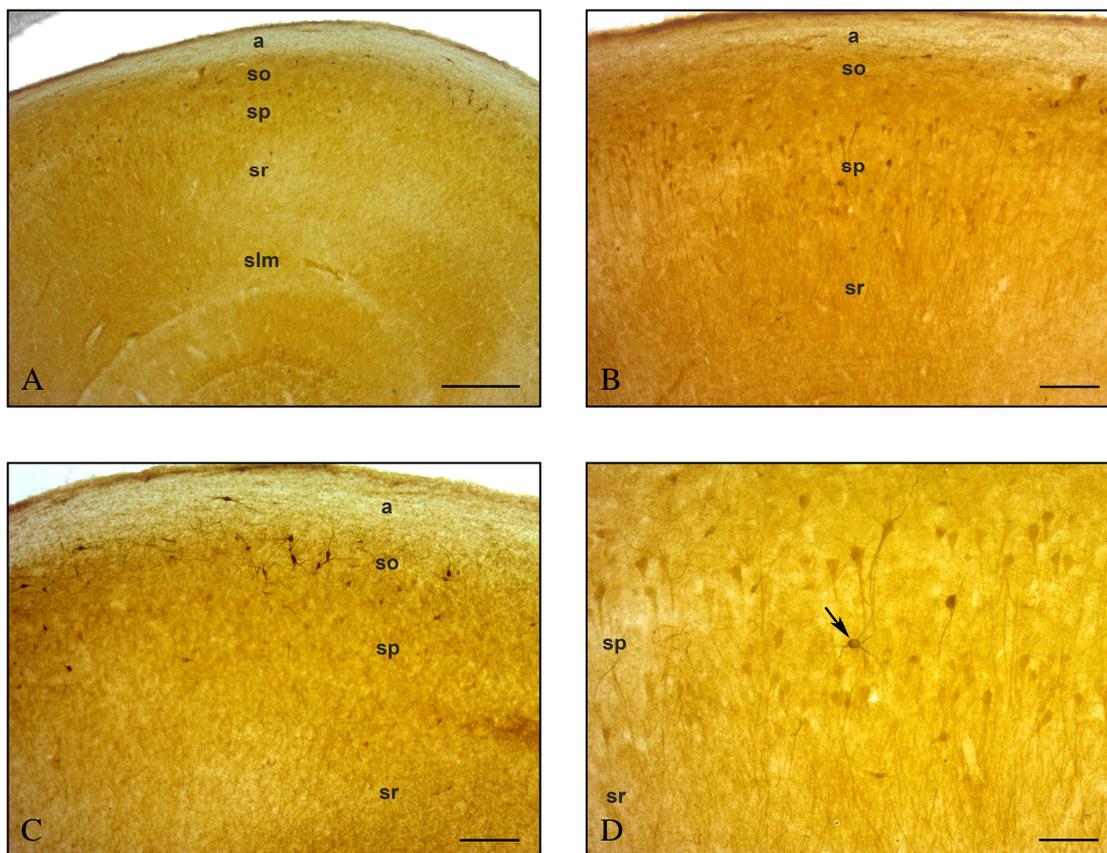
**Figura 6.** Distribuzione dell'immunoreattività per la parvalbumina nel subicolo di cane. Notare la scarsità di neuroni immunopositivi negli strati I, II e III del subicolo. Nello strato I si evidenziano grossi processi dendritici paralleli tra loro. Barra: 500  $\mu\text{m}$  in A; 200  $\mu\text{m}$  in B.



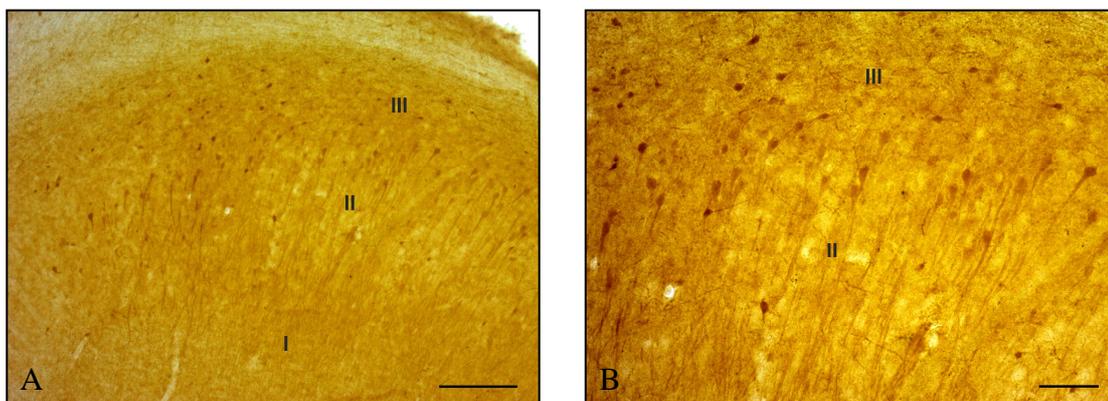
**Figura 7.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calbindina-D28k nel giro dentato di cane. Notare come i neuroni presenti nello strato dei granuli mostrino virtualmente tutti una forte immunoreattività (A-F). Sono evidenti i dendriti immunoreattivi presenti nello strato molecolare (A-E). Il neuropilo diffuso si presenta particolarmente marcato nello strato polimorfo ed, in minor misura, nello strato molecolare (A-E). Notare un neurone immunopositivo poligonale presente nello strato polimorfo (F). Abbreviazioni: sg, strato dei granuli; sl, strato lucido (campo CA3); sm, strato molecolare; sp, strato piramidale (campo CA3); spol, strato polimorfo. Barra: 500  $\mu$ m in A; 200  $\mu$ m in B; 100  $\mu$ m in C e D; 50  $\mu$ m in E e F.



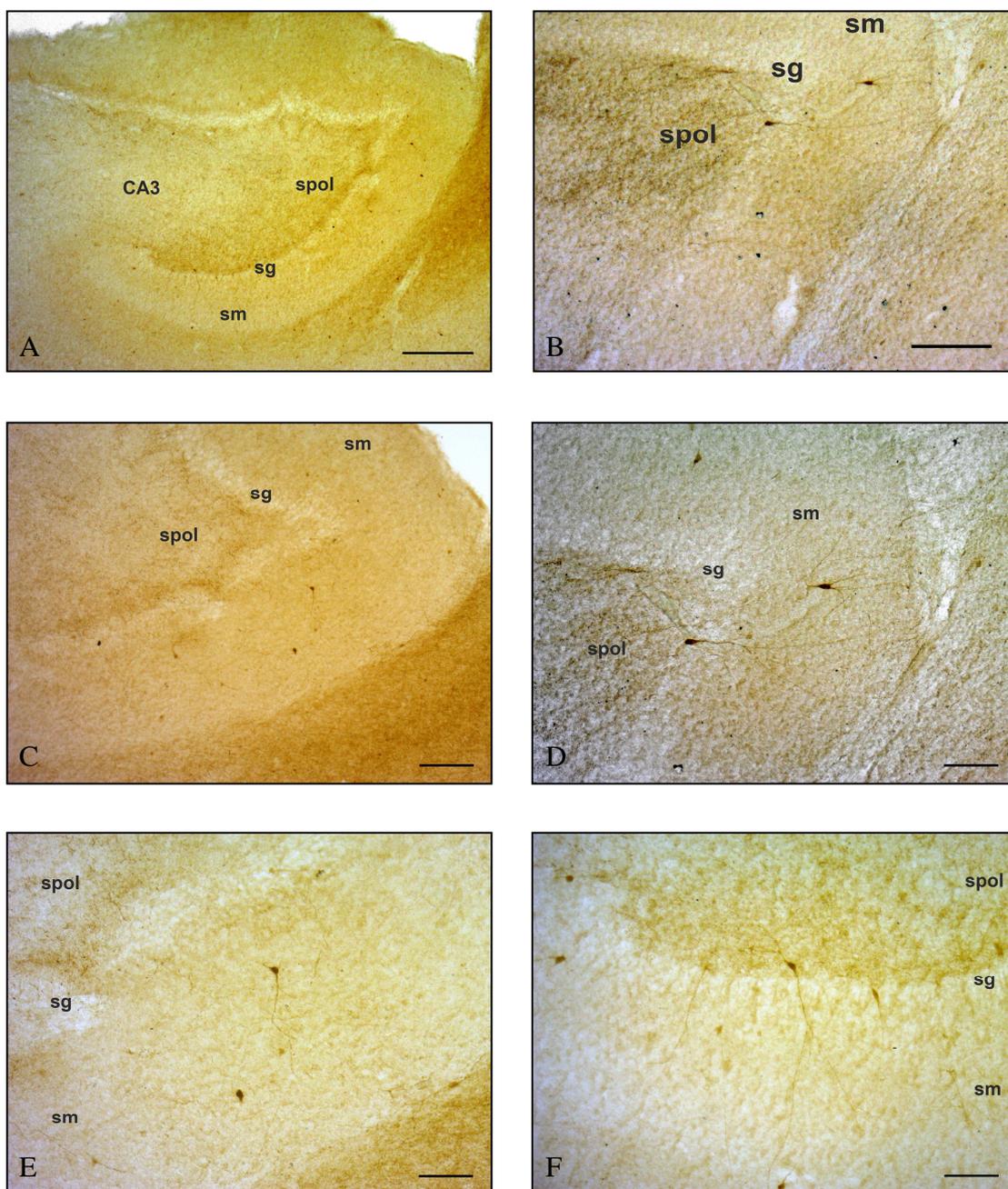
**Figura 8.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calbindina-D28k nel campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto di cane. Notare come le fibre muschiate presentino una forte immunoreattività (A-C). I neuroni immunoreattivi per questa proteina sono distribuiti soprattutto nello strato oriens (A-C). Abbreviazioni: slm, strato lacunoso-molecolare; sl, strato lucido; so, strato oriens; sp, strato piramidale; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu$ m in A; 200  $\mu$ m in B e C.



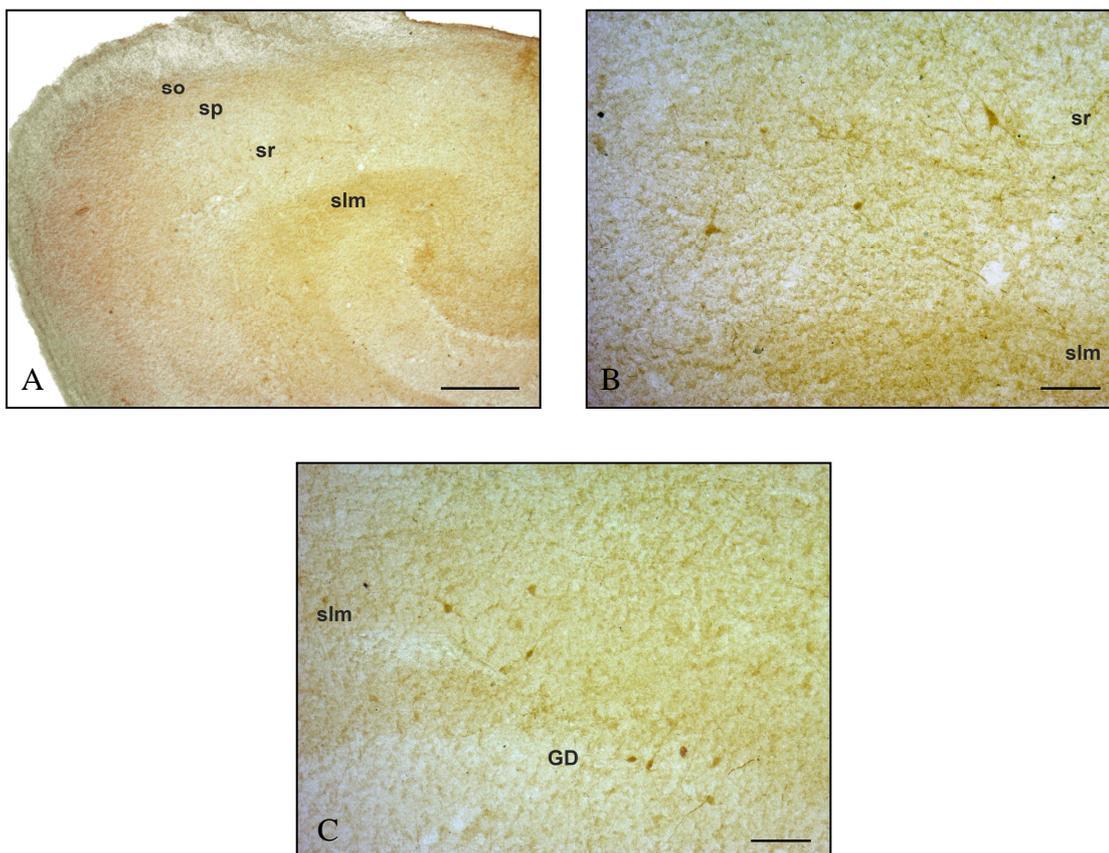
**Figura 9.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calbindina-D28k nel campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto di cane. Numerosi neuroni immunoreattivi sono presenti negli strati oriens e piramidale (A-D). Notare come l'immunoreattività sia più intensa negli interneuroni degli strati oriens che nelle cellule piramidali (A-C). Anche gli interneuroni immunopositivi presenti nello strato piramidale (freccia in D) presentano una forte marcatura. Abbreviazioni: slm, strato lacunoso-molecolare; so, strato oriens; sp, strato piramidale; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu$ m in A; 200  $\mu$ m in B e C; 100  $\mu$ m in D.



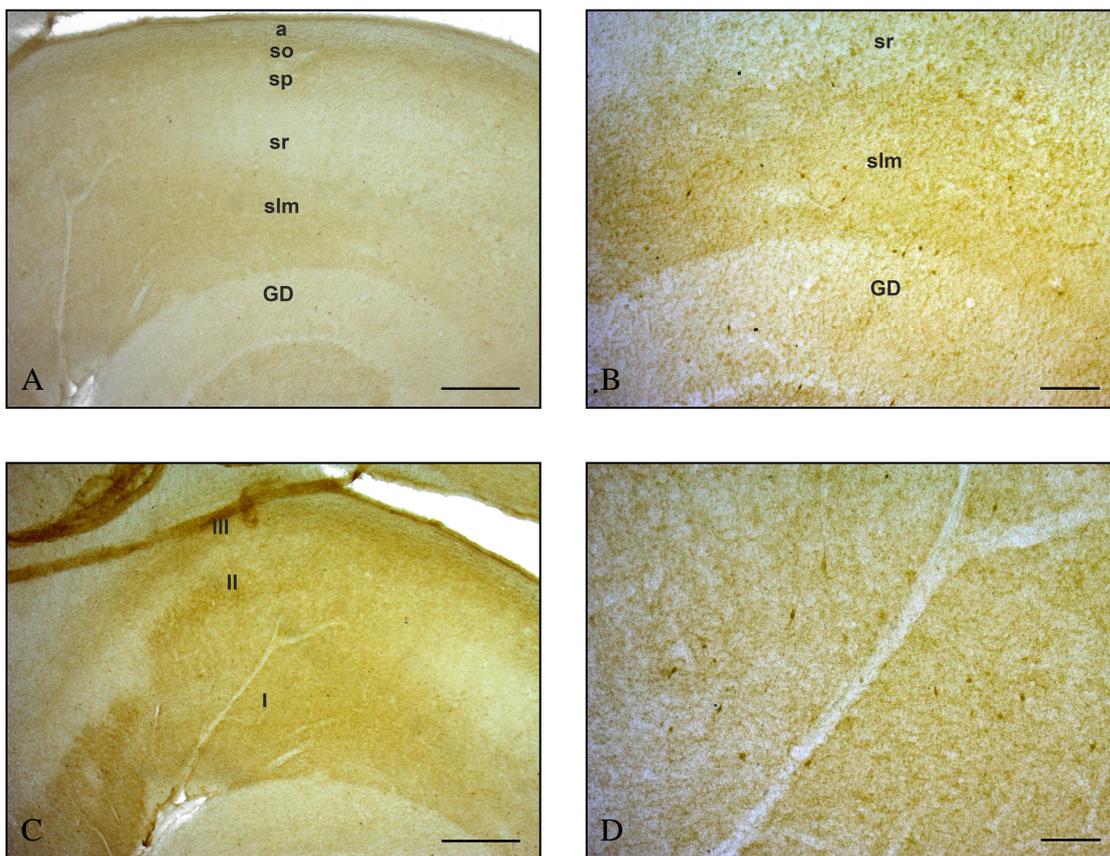
**Figura 10.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calbindina-D28k nel subicolo di cane. Notare la come i neuroni piramidali dello strato II mostrino un'evidente marcatura (A e B). Cellule immunoreattive di aspetto sferoidale e di ridotte dimensioni sono presenti nello strato III (A e B). Notare negli strati I e II i dendriti apicali dei neuroni piramidali immunoreattivi per la calbindina-D28k (A e B). Barra: 500  $\mu\text{m}$  in A; 200  $\mu\text{m}$  in B.



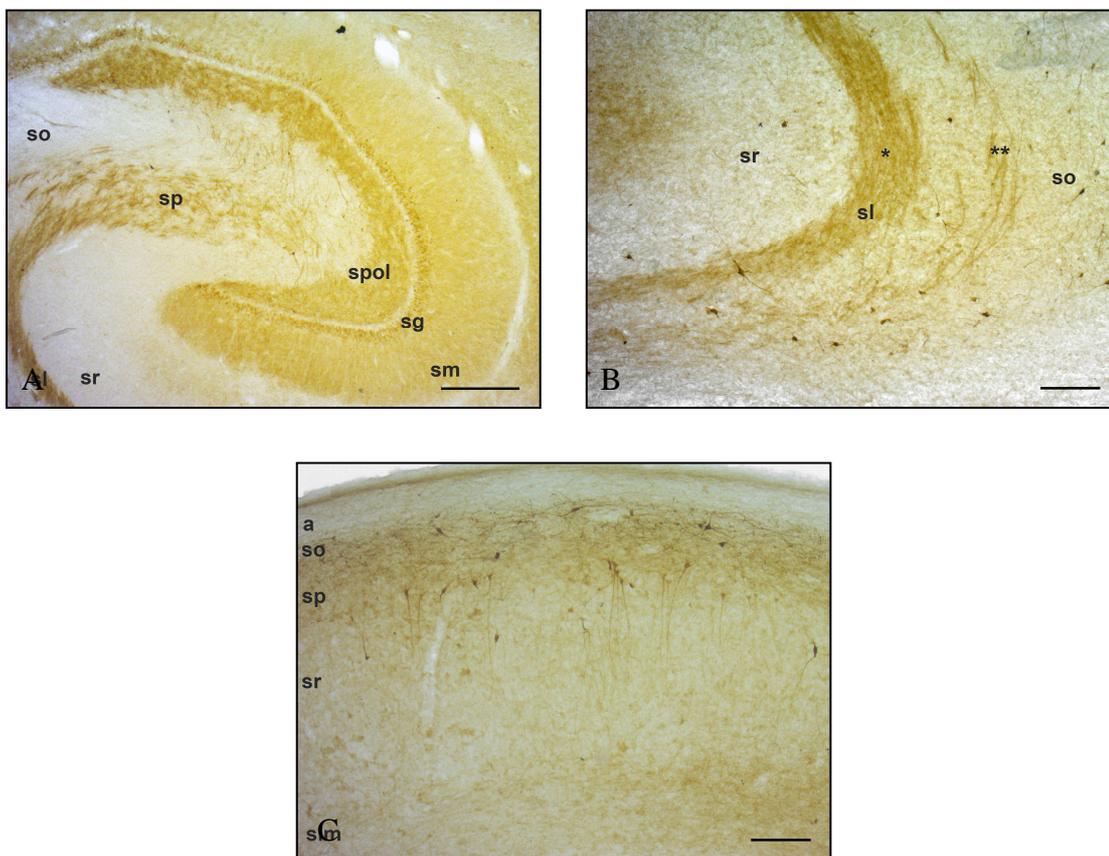
**Figura 11.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calretinina nel giro dentato di cane. Notare come l'immunoreattività per questa proteina sia presente soprattutto nei neuroni degli strati polimorfo e molecolare (A-F). Occasionalmente neuroni immunopositivi possono essere presenti nello strato dei granuli (B e D). La marcatura del neuropilo diffuso appare particolarmente evidente nello strato polimorfo (A-F). Abbreviazioni: sg, strato dei granuli; sm, strato molecolare; spol, strato polimorfo. Barra: 500  $\mu$ m in A; 200  $\mu$ m in B e C; 100  $\mu$ m in D-F.



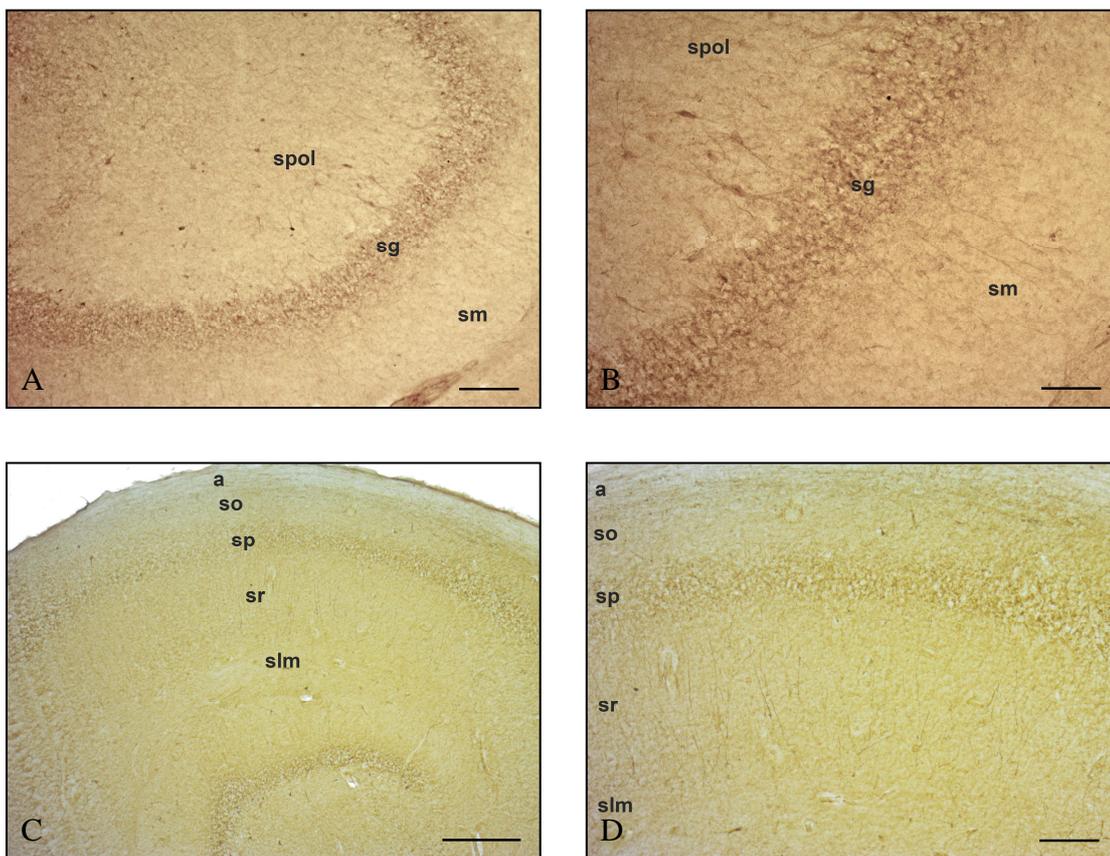
**Figura 12.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calretinina nel campo CA3 dell'ippocampo propriamente detto di cane. Il neuropilo appare più intensamente marcato negli strati oriens e lacunosomolecolare (A). Le cellule immunoreattive sono presenti soprattutto negli strati radiato e lacunosomolecolare (B e C). Abbreviazioni: GD: giro dentato; slm, strato lacunosomolecolare; so, strato oriens; sp, strato piramidale; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu$ m in A; 100  $\mu$ m in B e C.



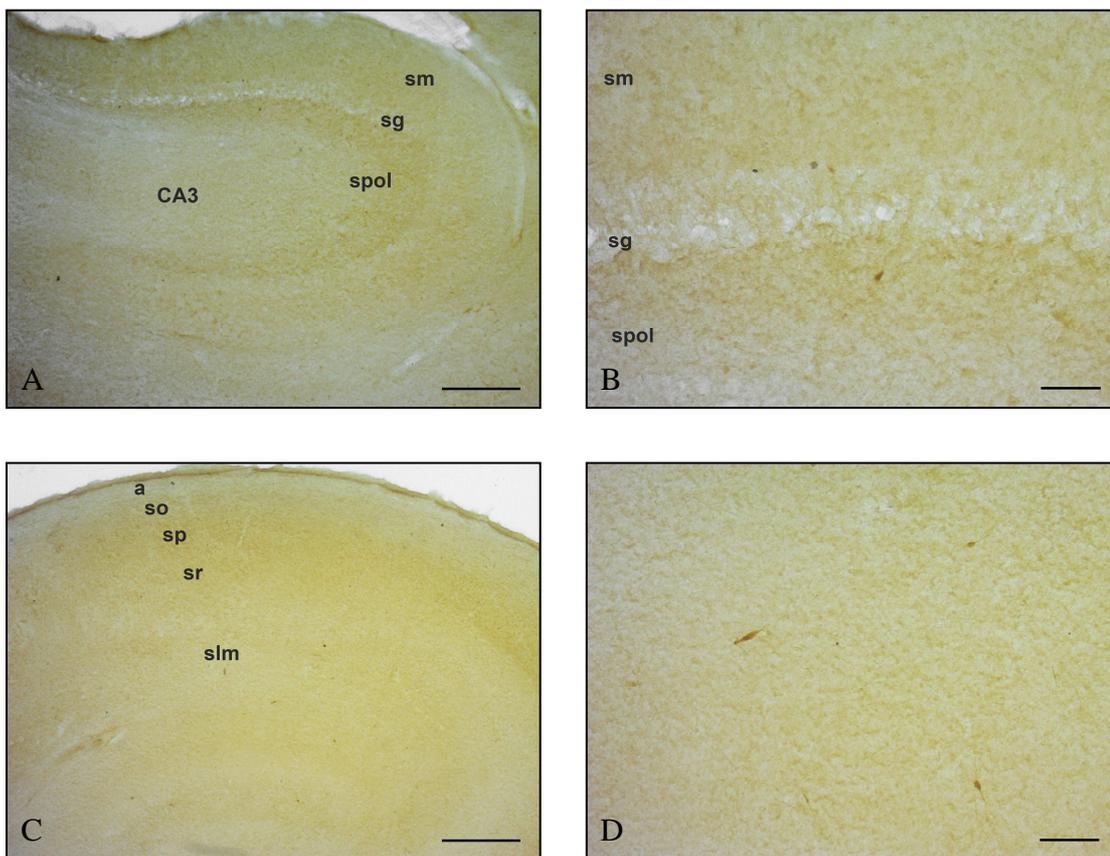
**Figura 13.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calretinina nel campo CA1 dell'ippocampo propriamente detto (A e B) e nel subicolo (C e D) di cane. Nel campo CA1 i neuroni immunoreattivi sono presenti negli strati oriens e lacunoso-molecolare, dove si evidenzia anche il neuropilo più intensamente marcato (A e B). Gli strati II e III del subicolo mostrano l'immunoreattività localizzata soprattutto nel neuropilo (C). Nel subicolo i neuroni immunoreattivi per questa proteina (poligonali o sferoidali e di piccole dimensioni) sono localizzati soprattutto nello strato I (D). Barra: 500  $\mu$ m in A e C; 200  $\mu$ m in B; 100  $\mu$ m in D.



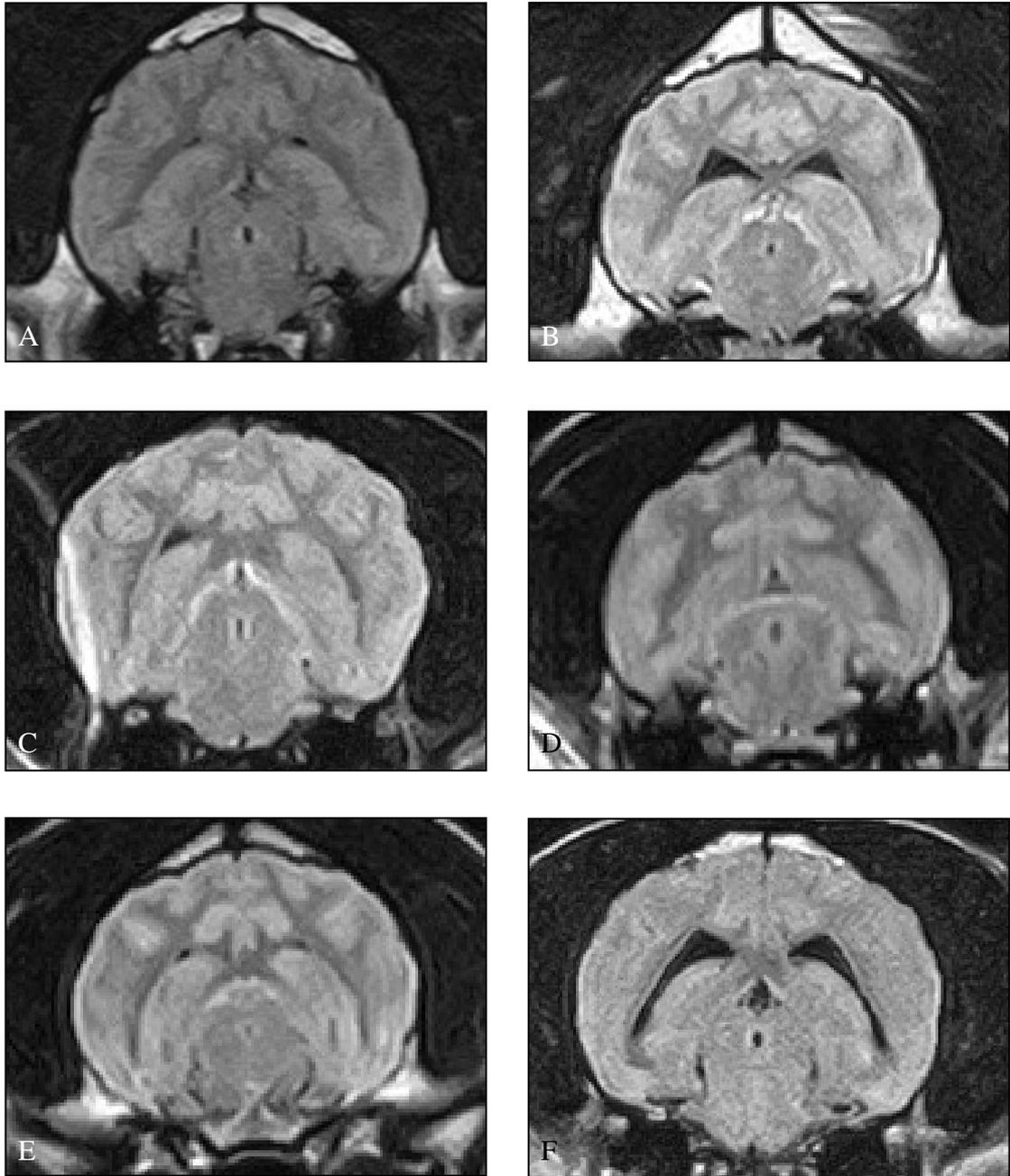
**Figura 14.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calbindina-D28k nel giro dentato (A), nel campo CA3 (B) e CA1 (C) dell'ippocampo propriamente detto di cane vecchio. La distribuzione dell'immunoreattività non mostra differenze rispetto a quanto osservato nei soggetti giovani (vedi figure 7-9). L'asterisco singolo indica le fibre musciate costituenti il fascio soprapiramidale (B). L'asterisco doppio si riferisce alle fibre musciate costituenti il fascio infrapiramidale (B). Abbreviazioni: sg, strato dei granuli; slm, strato lacunoso-molecolare (campo CA1); sl, strato lucido (campo CA3); sm, strato molecolare; so, strato oriens; sp, strato piramidale; spol, strato polimorfo; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu$ m in A; 200  $\mu$ m in B e C.



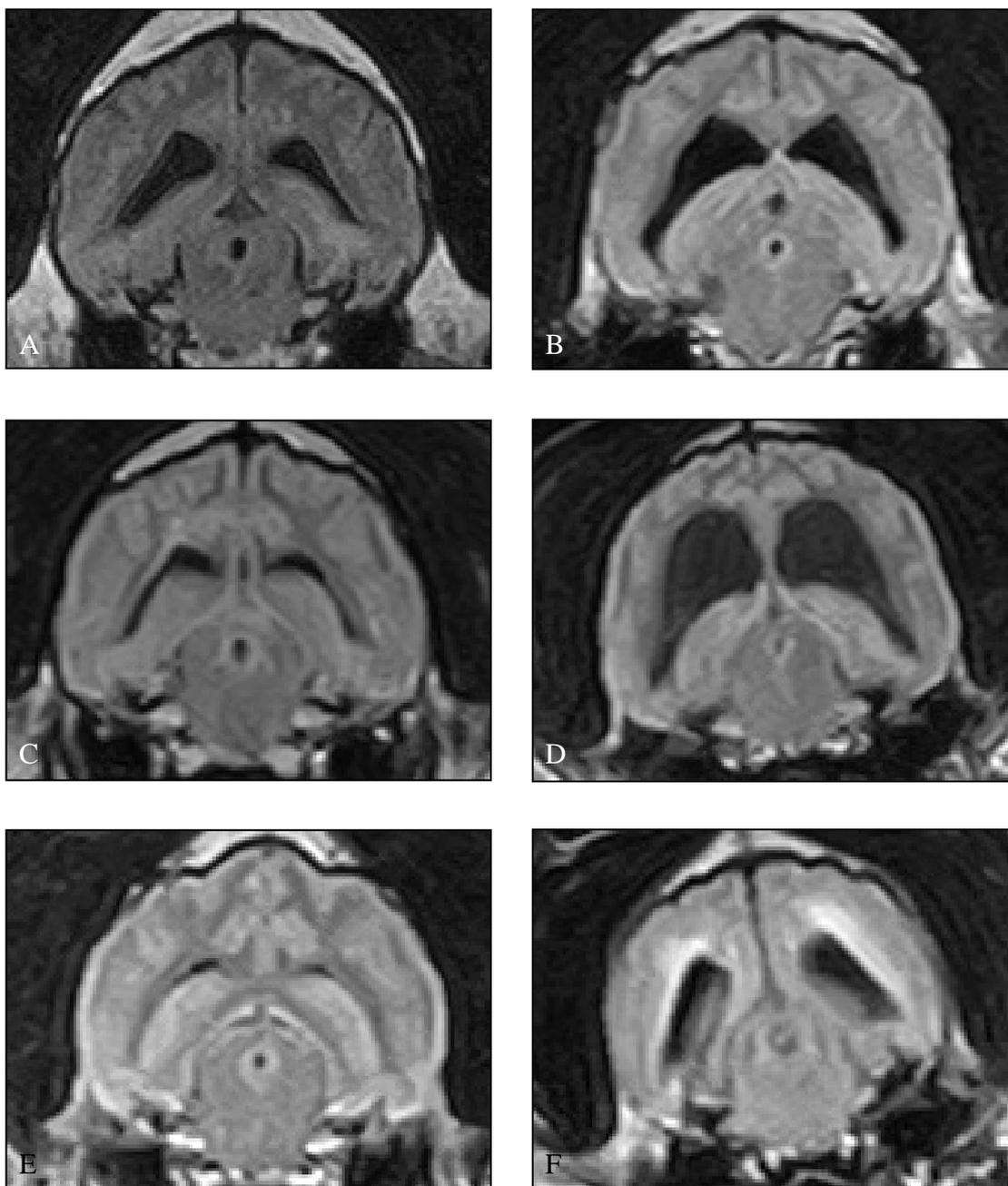
**Figura 14.** Distribuzione dell'immunoreattività per la parvalbumina nel giro dentato (A e B) e nel campo CA1 (C e D) dell'ippocampo propriamente detto di cane vecchio. Il numero di neuroni immunoreattivi per questa proteina è inferiore rispetto a quanto si osserva nei soggetti giovani (figure 3 e 5; spiegazione riportata nel testo). Abbreviazioni: sg, strato dei granuli; slm, strato lacunoso-molecolare; sm, strato molecolare; so, strato oriens; sp, strato piramidale; spol, strato polimorfo; sr, strato radiato. Barra: 200  $\mu$ m in A; 100  $\mu$ m in B e D; 500  $\mu$ m in C.



**Figura 15.** Distribuzione dell'immunoreattività per la calretinina nel giro dentato (A e B) e nel campo CA1 (C e D) dell'ippocampo propriamente detto di cane vecchio. In D è riportato un particolare riferito allo strato lacunoso-molecolare. Il numero di neuroni immunoreattivi per questa proteina è inferiore rispetto a quanto si osserva nei soggetti giovani (figure 11 e 13 A e B; spiegazione riportata nel testo). Abbreviazioni: sg, strato dei granuli; slm, strato lacunoso-molecolare; sm, strato molecolare; so, strato oriens; sp, strato piramidale; spol, strato polimorfo; sr, strato radiato. Barra: 500  $\mu$ m in A e C; 100  $\mu$ m in B; 50  $\mu$ m in C.



**Figura 16.** Immagini FLAIR ottenute alla risonanza magnetica riferite all'encefalo di animali giovani. A e B appartengono a cani di razza Labrador Retriever; C-F si riferiscono a cani appartenenti alla razza Jack Russel Terrier.



**Figura 17.** Immagini FLAIR ottenute alla risonanza magnetica riferite all'encefalo di animali vecchi. A e B appartengono a cani di razza Labrador Retriever; C e D si riferiscono a cani appartenenti alla razza Border Terrier; E e F appartengono a cani di razza Jack Russel Terrier.